

---

# Quantitative Real-time PCR zum spezifischen Nachweis transrenaler DNA des Mycobacterium tuberculosis complex

Andreas Lorenz

---



München 2010

Aus der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin  
der Medizinischen Klinik Innenstadt  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Leiter:  
Professor Dr. med. Thomas Löscher

Quantitative Real-time PCR zum spezifischen Nachweis transrenaler DNA des Mycobacterium  
tuberculosis complex

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von Andreas Reinhard Johannes Lorenz  
aus München

2010



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Michael Hölscher

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Sören Schubert

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 29.04.2010

*für Maximilian*

---

<b>1</b>	<b>Einleitung und Historisches zur Tuberkulose</b>	<b>6</b>
1.1	Älteste Hinweise auf Tuberkulose	6
1.2	Zeugnisse von Tbc vom Altertum bis zur Moderne	6
1.3	Die Entdeckung der Ätiologie der Tuberkulose	8
1.4	Die Revolution in der Behandlung	8
<b>2</b>	<b>Derzeitige Standards und Perspektiven zur Tuberkulose</b>	<b>9</b>
2.1	Epidemiologie der Tuberkulose	9
2.1.1	Ursprung, Evolution und Verbreitung der Tuberkulose	9
2.1.2	Epidemiologie weltweit und speziell in Tansania	11
2.1.3	Gesundheitspolitische Bedeutung (Public Health)	14
2.2	Mikrobiologie, Pathogenese, Klinik, Prävention und Therapie	14
2.2.1	Erreger	14
2.2.2	Übertragungswege und Infektiosität	15
2.2.3	Pathogenese	15
2.2.4	Klinik	16
2.2.5	Prävention	18
2.2.6	Therapie	19
2.3	Spezielle Aspekte der HIV/TB – Co-Infektion	21
2.4	Diagnostik der Tuberkulose	24
2.4.1	Zur Verfügung stehende Diagnostik	24
2.4.2	Diagnostik in den Tropen	26
2.4.3	Probleme in der Diagnostik	26
2.4.4	Stand der Forschung	28
2.5	Internationale Programme zur Bekämpfung der Tuberkulose	32
2.5.1	DOTS (Directly Observed Treatment – short course) und DOTS-PLUS	32
2.5.2	StopTB	33
2.5.3	Foundation for Innovative New Diagnostics (Find)	33
<b>3</b>	<b>Problemstellung und Zielsetzung</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>37</b>
4.1	Überblick und Vorarbeiten	37
4.2	Etablierung der konventionellen PCR (Polymerase chain reaction)	39
4.3	Weiterentwicklung zur quantitativen real-time PCR	44
4.4	Evaluierung von drei DNA-Extraktionsmethoden mit Hilfe gespikter Urine	47
4.4.1	Herstellung gespikter Urine	47
4.4.2	Puregene Extraktion	48
4.4.3	Quiagen Extraktion	49
4.4.4	Promega Extraktion	50

---

<b>4.5</b>	<b>Einsetzen extrahierter DNA in die q-rt-PCR</b>	<b>50</b>
<b>4.6</b>	<b>Vergleich der Extraktionsmethoden mit längerer Plasmid-DNA</b>	<b>50</b>
<b>4.7</b>	<b>Anwendung von DNA-Extraktion und PCR an klinischen Urinproben aus Mbeya, Tansania</b>	<b>51</b>
4.7.1	Studienort	51
4.7.2	Probengewinnung, Transport, Lagerung	51
4.7.3	Verarbeitung der gewonnenen Urinproben	52
<b>4.8</b>	<b>Material</b>	<b>53</b>
4.8.1	Chemikalien	53
4.8.2	Enzyme	53
4.8.3	Geräte	53
4.8.4	Kommerzielle Kits	54
4.8.5	Sonstiges	55
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>56</b>
<b>5.1</b>	<b>Klonierung</b>	<b>56</b>
<b>5.2</b>	<b>Bestimmung der Konzentration des cfp32-Genabschnitts</b>	<b>57</b>
<b>5.3</b>	<b>Optimierung der PCR</b>	<b>58</b>
<b>5.4</b>	<b>Evaluation unterschiedlicher Extraktionsmethoden bezüglich Inhibierung und Potenz</b>	<b>60</b>
<b>5.5</b>	<b>Evaluation an klinischen Proben</b>	<b>66</b>
5.5.1	Analyse der qualitativen Testaussage	67
5.5.2	Analyse der quantitativen Werte	68
5.5.3	Abhängigkeit der Testperformance vom Patientengeschlecht	69
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>71</b>
<b>6.1</b>	<b>Überlegungen zu physiologischen und pathophysiologischen Aspekten</b>	<b>71</b>
<b>6.2</b>	<b>Methodische Aspekte</b>	<b>74</b>
<b>6.3</b>	<b>Alternativen der DNA-Extraktion</b>	<b>76</b>
<b>6.4</b>	<b>Aussagekraft der q-rt-PCR</b>	<b>78</b>
<b>6.5</b>	<b>Schlussfolgerungen</b>	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>81</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>83</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>92</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung</b>	<b>99</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>100</b>

## **1 Einleitung und Historisches zur Tuberkulose**

Die Tuberkulose (Abk. TB, TBC oder Tbc) gilt als eine der ältesten Infektionskrankheiten der Menschheit. Anhand der Geschichte der Tuberkulose lassen sich die unterschiedlichen Vorstellungen von Krankheit im Lauf der Zeit nachvollziehen, die in der medizinischen und gesellschaftlichen Wahrnehmung und Diskussion erkennbar geworden sind. Die Medizingeschichte zeigt auch, wie einzelne Wissenschaftler mit herausragenden Leistungen zur Aufklärung der Krankheit beigetragen haben. Wie andere schwere Krankheiten, die die Menschheit in existentieller Weise bedroht haben, hat auch die Tuberkulose zu Fortschritten in der Medizin geführt, durch die andere Krankheiten besser verstanden und behandelt werden können.

### **1.1 Älteste Hinweise auf Tuberkulose**

Aus der „Natural Trap Cave“, einer 30 Meter tiefen Höhle in Wyoming, stammen die bisher ältesten Beweise für eine Tuberkuloseinfektion. Aus einem Knochen einer ausgestorbenen Bisonart, dessen Alter per Radiokohlenstoffdatierung auf  $17870 \pm 230$  Jahre bestimmt wurde, konnten Rotschild et. al.<sup>81</sup> DNA gewinnen und diese als Tuberkulose-DNA identifizieren. Die ältesten Hinweise auf Tuberkulose beim Menschen stammen von Knochen aus der Zeit um 8000 v.Chr.<sup>47</sup> Während es sich hierbei um für Tuberkulose typische Pathologien in der Knochenmorphologie handelt, sind Nachweise auf spezifische Tuberkulose -DNA an ägyptischen Mumien aus der Zeit um 2050 v. Chr. Beweise für die Existenz der Tuberkulose auf molekularer Ebene.<sup>100</sup>

Herzog beschäftigt sich in seinem Review-Artikel „History of Tuberculosis“<sup>47</sup> mit Zeugnissen und geschichtlich überlieferten Fakten zur Tuberkulose vom Altertum bis in die Moderne. Im Folgenden wird eine kurze Zusammenfassung dieses Artikels gegeben (restlicher Teil des Kapitels „Einleitung und Historisches zur Tuberkulose“, bis Seite 8):

### **1.2 Zeugnisse von Tbc vom Altertum bis zur Moderne**

Als erstes schriftliches Zeugnis der Tuberkulose gilt der älteste Gesetzestext der Welt, den der babylonische Herrscher Hammurabi im Jahre 1948 bzw. 1905 v.Chr. verfasst hat.

Der griechische Arzt Hippokrates bzw. die hippokratische Schule prägen den Begriff der „Phthisis“, der Auszehrung (auch „Schwindsucht“), und beschreiben sie als eine weit verbreitete tödlich verlaufende Krankheit. Aber auch in der indischen Literatur um 1500 v. Chr. finden sich Schilderungen, die sich mit dem Krankheitsbild der Tuberkulose decken.

Im fünften Jahrhundert n. Chr. beschreibt der römische Arzt Caelius Aurelianus die Krankheit mit den Worten:

*„Der Patient leidet an einem latenten Fieber, das gegen Abend beginnt und gegen Tagesanbruch verschwindet. Es ist begleitet von heftigem Husten mit eitrigem Auswurf. Der Patient spricht mit heiserer Stimme, atmet schwer und hat gerötete Backen. Die Haut des restlichen Körpers ist kreidebleich. Die Augen haben einen müden Ausdruck, der Patient hat ein hageres Erscheinungsbild, aber zeigt oft erstaunliche physische und mentale Aktivität. In vielen Fällen kann man ein Pfeifen über der Brust hören, und wenn sich die Krankheit ausbreitet, findet sich Schweiß auf dem oberen Teil der Brust. Die Patienten verlieren ihren Appetit oder leiden quälenden Hunger. Sie sind oft sehr durstig. Die Enden der Finger schwellen an und die Fingernägel biegen sich stark.“* (übersetzt nach Herzog, History of tuberculosis, Respiration 1998;<sup>47</sup>)

Während zunächst die Bezeichnung „Phthisis“ für jede Art der Auszehrung gebraucht worden ist, wird im fünfzehnten und sechzehnten Jahrhundert in Italien die Bezeichnung nur noch für die Lungenerkrankung benutzt. Mit dem Beginn der Pathoanatomie zwischen dem vierzehnten und siebzehnten Jahrhundert werden der Tuberkulose Geschwüre in der Lunge, fibrotische und miliäre Formen zugeschrieben. Bedeutende Anatomen dieser Zeit waren Giralomo Fracastoro (1478-1553), Giovanni Morgagni (1682-1771) und Thomas Willis (1621-1675). Es wird bereits die Meinung vertreten, dass die Tuberkulose infektiös sei. Jedoch existiert auch noch die Vorstellung von erblichen Ursachen der Erkrankung. So hält noch 1720 der englische Arzt Benjamin Marten (1704-1722) an der Vererbung der Krankheit fest, obwohl er kleine Lebewesen für verantwortlich hält<sup>34</sup>, wie sie seit der Entdeckung des Mikroskops (um 1600) gesehen werden.

### **1.3 Die Entdeckung der Ätiologie der Tuberkulose**

Viele Jahrhunderte sind geprägt vom Streit über die Ätiologie der Krankheit. Die Vorstellungen gehen von erblicher, tumoröser bis zu infektiöser Entstehung. Darüber hinaus streitet man sich, ob die unterschiedlichen Organmanifestationen der Tuberkulose überhaupt eine gemeinsame Ursache haben. Der Berliner Philipp Kléncke beweist 1843, dass die Tuberkulose übertragbar ist, indem er Hasen Material aus einem Tuberkel injiziert und diese darauf an generalisierter Tbc erkranken. 1844 erkennt Jakob Henle, dass Tuberkulose bei einer bestehenden Prädisposition ansteckend sei. Er stellt seine Postulate für das Vorhandensein einer Infektionskrankheit auf. Aber erst sein Schüler Robert Koch (1843-1910) weist ein Bakterium als Auslöser von Tuberkulose nach und führt den Beweis in einer Vorlesung an der Charité in Berlin am 24. März 1881.

### **1.4 Die Revolution in der Behandlung**

Die Behandlung der Tuberkulose ist lange Zeit nicht kausal. Neben Meinungen, die Tuberkulose sei überhaupt nicht, oder wenn, dann nur im Anfangsstadium zu heilen, gibt es schon früh die Überzeugung, dass eine Behandlung in Sanatorien Erfolg versprechend ist. Schon zu Zeiten des Hippokrates werden Kranke im Tempelbezirk mit gutem Essen und physischen Trainingsübungen behandelt. In der Mitte des neunzehnten Jahrhunderts entstehen in Europa die ersten Sanatorien, meist in den Bergen, die man für „immune Orte“ hält. Ruhe, gutes Essen und die Höhenluft führen zu relativ hohen Spontanheilungsraten, auch wenn die Langzeitergebnisse nicht ermutigend sind. Ab den dreißiger Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts wird die Kollapstherapie, also die Anlage eines Pneumothorax, nach und nach neben der Sanatoriumsbehandlung eingeführt. Durch Erzeugen eines Pneumothorax bzw. Pneumoperitoneums kommt es zum Verkleben der Kavernen und zum Abknicken des zur Kaverne führenden Bronchus. Den Beginn der modernen medikamentösen Behandlung leitet Selman Waksman ein, der 1943 aus dem Pilz *Streptomyces griseus* das Antibiotikum Streptomycin herstellt. Es folgen weitere antituberkulös wirksame Medikamente wie sie teilweise auch heute noch eingesetzt werden: p-Aminosalicylsäure (1949), Isoniazid (1952), Pyrazinamid (1954), Cycloserin (1955), Ethambutol (1962), Rifampicin (1963) und die neueren Aminoglykoside und Quinolone. Erst die Ära der Antibiotika bringt die Möglichkeit, die Tuberkulose heilen zu können.

## **2 Derzeitige Standards und Perspektiven zur Tuberkulose**

### **2.1 Epidemiologie der Tuberkulose**

#### **2.1.1 Ursprung, Evolution und Verbreitung der Tuberkulose**

Die Erkenntnisse über die molekulare Epidemiologie der Tuberkulose sind zwar noch lückenhaft, Stead<sup>86</sup> stellt aber Hypothesen zum Ursprung und der Evolution der heute Tuberkulose auslösenden Mykobakterien auf. Demnach sind die Anfänge der Familie der Mykobakterien vor einigen Millionen Jahren zu sehen, lange vor Auftreten tierischen Lebens. Die ersten Mykobakterien sind saprophytische Bakterien, die in der Erde leben und Teil des Kompostierungsprozesses von Pflanzen sind. Durch zufällige Mutation ergeben sich Spezies, die später in Tieren als Parasiten leben können. Zur Zeit der ersten Säugetiere tritt *Mycobacterium bovis* in Erscheinung und wird von der Beute auf den Räuber übertragen. Es besitzt noch nicht die Fähigkeit sich über die Luft zu verbreiten und tritt beim Menschen nur sporadisch auf, wenn es über Wildfleisch aufgenommen wird. Vor 8000 bis 10000 Jahren werden in Europa Tiere domestiziert und Milch und Milchprodukte werden in den Speiseplan aufgenommen. In den kalten Wintern leben Tier und Mensch zusammen im gleichen Haus und aus *Mycobacterium bovis* entwickelt sich *M. tuberculosis*. Die neue Mutante hat eine Nische gefunden, in der es größtenteils einen Wirtswechsel vom Tier auf den Menschen vorgenommen hat. Die geografischen Hürden begrenzen allerdings die Verbreitung und bedingen unterschiedliche Zeitpunkte in den jeweiligen Populationen, an denen die Endemie in eine Epidemie übergeht. Stead betont, dass Grigg`s Kurve zum zeitlichen Verlauf der Epidemiologie einer Infektionskrankheit auch auf die Tuberkulose angewandt werden könne. Grigg`s Kurve beschreibt universell für jede Infektionskrankheit, dass nach einer endemischen Phase der Anstieg zu Beginn einer Epidemie steil verläuft, einen Höhepunkt erreicht und in einen langsamen Abstieg bis zur Grundlinie übergeht. Im Fall der Tuberkulose dauert solch ein Verlauf dreihundert Jahre (siehe Abbildung 1).

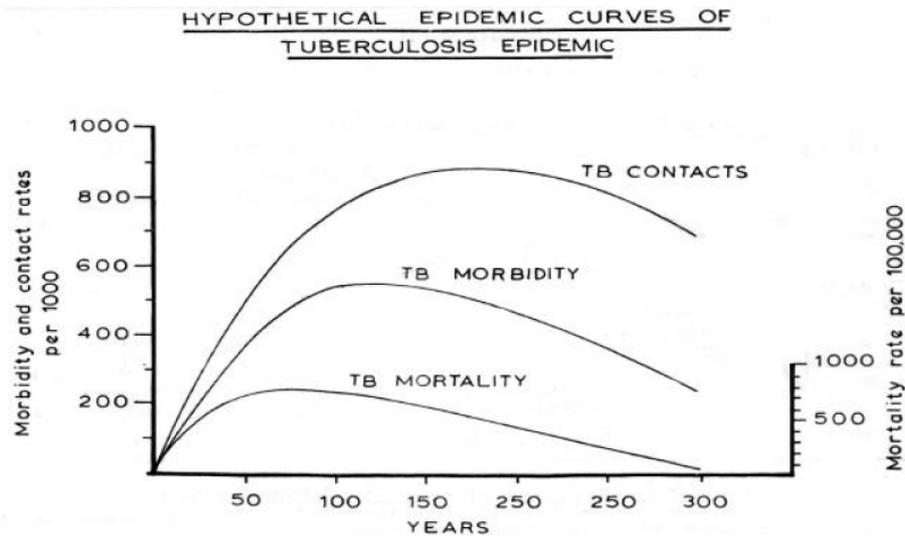


Abbildung 1: Grigg's Kurve zum Verlauf einer Tuberkuloseepidemie (aus Gothi<sup>43</sup>)

Stead sieht die ungleiche Prävalenzverteilung der Tuberkulose heutzutage als Folge unterschiedlich weit fortgeschrittener Entwicklung auf Grigg's Kurve in den verschiedenen Teilen der Welt. Er bezweifelt sogar den Effekt von menschlichen Interventionen auf den Verlauf der Kurve gegenüber dem starken Einfluss der natürlichen Resistenzentwicklung von Populationen, der sich selbst bei der HIV (Humanes Immundefizienz-Virus) - Epidemie in Zukunft zeigen werde.

Für Jahrhunderte bleibt die Tuberkulose eine sporadische Krankheit, die ihren Wirt zu schnell tötet und damit die Weitergabe verhindert. Nur langsam gibt es Individuen, die die erste Ansteckungsphase überleben. Aber es fehlen noch die äußeren Umstände, die zu einer Epidemie führen können. Erst die Industrielle Revolution in Europa im achtzehnten Jahrhundert liefert die nötigen Voraussetzungen: Armut und enges Zusammenleben in den Städten.

Die Tuberkulose wird zwar in die überseeischen Kolonien eingeschleppt, verbreitet sich aber nicht bis ins Landesinnere.

In Afrika findet man zur Zeit der europäischen Epidemie Infektionen nur an der Küste. Die eingeschleppte Krankheit tötet die Infizierten zu schnell, um sich auszubreiten. Europäer dringen wegen Malaria und Gelbfieber nicht in abgeschiedene Gebiete im Landesinneren vor. Außerdem wird der überwiegende Aufenthalt im Freien als Schutzfaktor gegenüber der sich über Luft übertragenden Tuberkulose angesehen. Erst um 1910 spricht man vom Beginn der Epidemie in Afrika, ausgelöst durch die Erholungskuren europäischer Tuberkulosepatienten in Südafrika und die Anwerbung von afrikanischen Männern in französische und ägyptische Heere.

Es existiert allerdings auch die Meinung, dass Tuberkulose zumindest an manchen Orten Afrikas vor einem europäischen Erstkontakt präsent war. Daniel<sup>30</sup> liefert anhand von Patientendaten von 1897 aus einem Krankenhaus in Buganda am nördlichen Ufer des Viktoriasees Hinweise auf damals schon vorhandene Fälle pulmonaler Tuberkulose. Im Gegensatz hierzu erwähnt Stead<sup>87</sup>, dass die afrikanischen Sklaven, die nach Amerika gebracht worden seien, keine Tuberkulose gehabt hätten.

### 2.1.2 Epidemiologie weltweit und speziell in Tansania

Die Tuberkulose ist die am weitesten verbreitete Infektionskrankheit der Welt. Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ist ein Drittel der Weltbevölkerung mit den Tuberkulose auslösenden Mykobakterien infiziert. Man rechnet mit rund acht Millionen Menschen jährlich, bei denen die Krankheit neu ausbricht und mit rund zwei Millionen Patienten, die an Tuberkulose versterben.<sup>15</sup> Während andere Krankheiten in Zukunft an Bedeutung zunehmen oder verlieren werden, geht man davon aus, dass die Tuberkulose eine konstant hohe Zahl an Todesfällen mit sich bringen wird (siehe Abbildung 2).

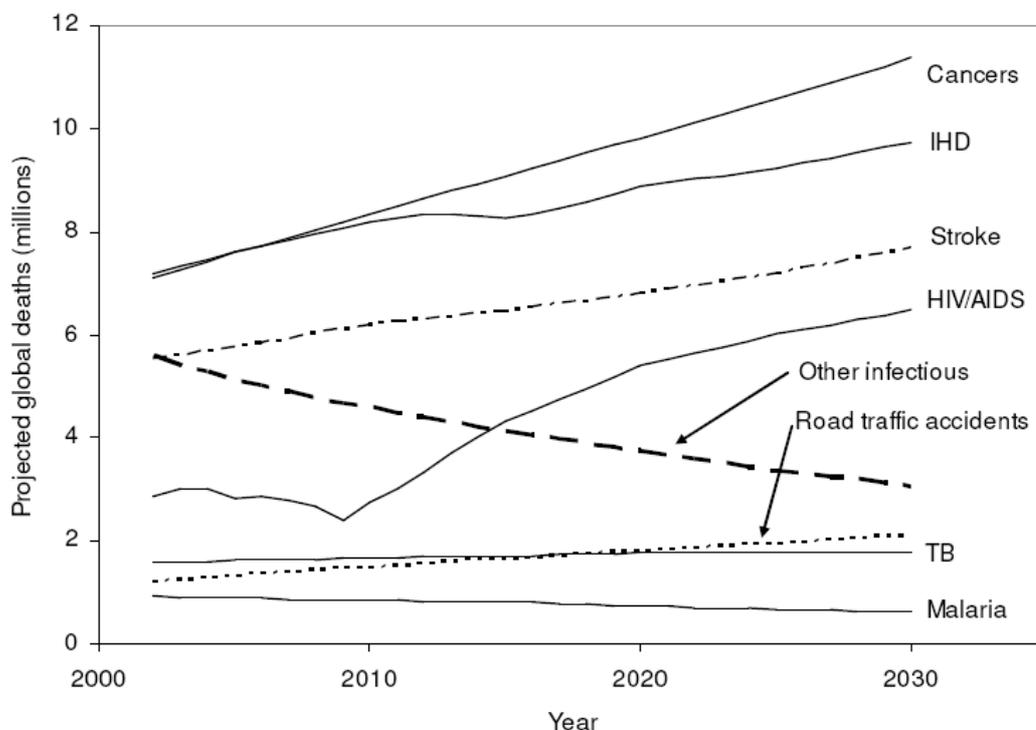


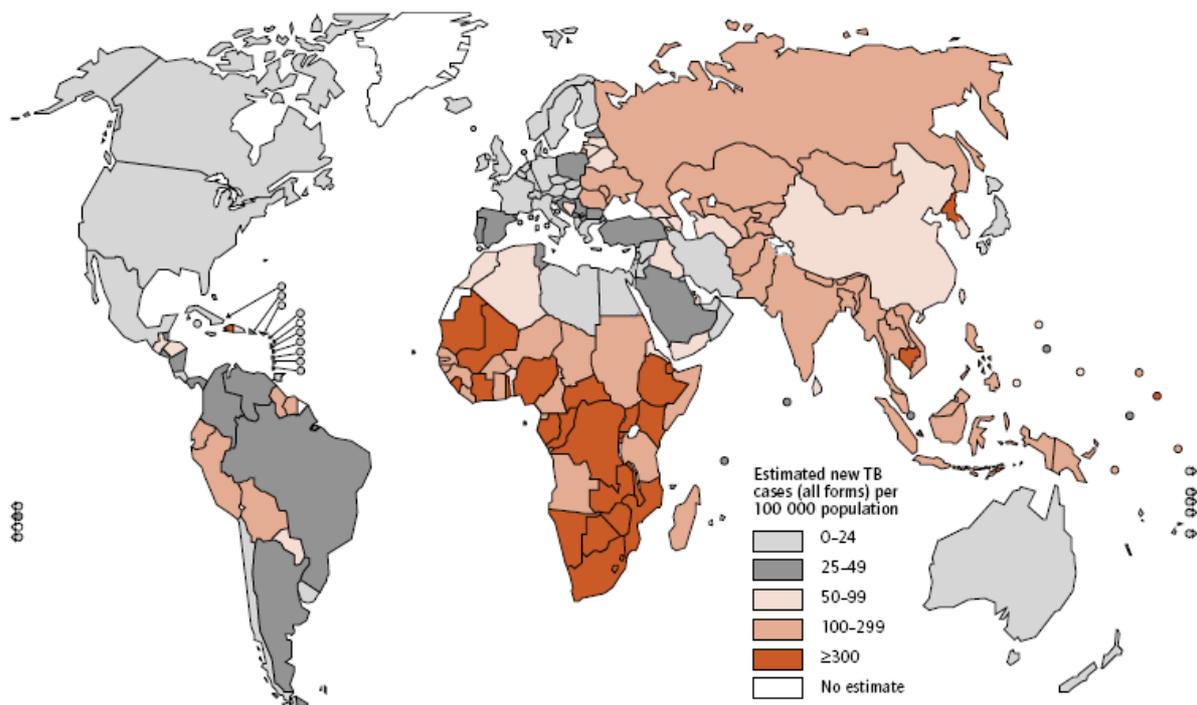
Abbildung 2: Weltweite Entwicklung von Todesursachen von 2000 – 2030 (Quelle: WHO<sup>65</sup>)

Zahlen zur weltweiten Situation der Tuberkulose liefert der Global TB Control Report 2009<sup>9,10</sup> der Weltgesundheitsorganisation. Dort werden Inzidenzen und

Prävalenzen bis zum Jahr 2007 statistisch aufgearbeitet. Tabelle 1 zeigt Auszüge des Berichtes.

Ist die Inzidenzrate für Tuberkulose 2004 weltweit noch um 0,6% gestiegen, vor allem bedingt durch eine Inzidenzzunahme in Afrika, sinkt sie seitdem leicht. Die weltweite Prävalenz hat von 296 pro 100.000 Einwohner im Jahr 1990 auf 206 im Jahr 2007<sup>9,10</sup> abgenommen.

Abbildung 3 zeigt, dass die höchsten relativen Inzidenzraten zum allergrößten Teil in afrikanischen Ländern südlich der Sahara zu finden sind.



**Abbildung 3: Geschätzte Anzahl an neuen Fällen mit TBC pro 100000 Einwohner 2007 ( aus WHO Report 2009 <sup>9,10</sup> )**

In Tansania, aus dem klinische Proben für diese Arbeit stammen, stellt sich die Lage 2007 wie folgt dar (vgl. Tabelle 1):

Bei einer Einwohnerzahl von ca. 40,4 Millionen erkrankten 120291 Individuen neu an Tuberkulose. Davon sind 47 % HIV-positiv. Jährlich versterben über 30000 Menschen.

Tabelle 1: Epidemiologische Daten zur Ausbreitung der Tuberkulose weltweit, in Afrika sowie in Tansania (aus WHO Report 2009<sup>9,10</sup>), Zahlen geschätzt, nicht gemeldete Fälle.

	Global	Afrika	Tansania
Inzidenz 2007, alle Formen,geschätzt	9 272 799	2 879 434	120 291
Inzidenz 2007 pro 100000 Einwohner	139	363	297
HIV Prävalenz bei erwachsenen inzidenten TB-Fällen in %	15	38	47
Anzahl neuer extrapulmonaler TB-Fälle	770811	223 322	12 526
Prävalenz 2007, alle Formen*	13 722 534	3 766 069	136 253
TB Mortalität 2007, alle Formen*	1 771 733	734 891	31 504

\*„alle Formen“ schließt Patienten mit HIV ein.

Im speziellen handelt es sich um die tansanische Region Mbeya, in der von Patienten Urinproben genommen worden sind. In dieser Region liegen die Zahlen nach Schätzungen noch höher als im tansanischen Durchschnitt. Ab dem Ende der Neunziger Jahre verläuft die Kurve der Melderate für TB-Fälle aus der Region Mbeya über der gesamtansanischen Kurve (siehe Abb. 4). Deutlich wird in Abbildung 4 auch, dass die gemeldeten Fälle stark über den mittels Sputumausstrich positiv diagnostizierten Fällen liegen. Dies lässt auf eine hohe Zahl klinischer Diagnosen mit exploratorischer Therapie als Folge des Mangels an verlässlichen Diagnostikmethoden schließen. Im Jahr 2004 sind in Mbeya 4753 Fälle von Tuberkulose gemeldet worden. Die jährliche Inzidenzrate für TB in Mbeya wird auf 0,4% geschätzt. 60 bis 70 % der Tuberkuloseinfizierten sind mit dem HI-Virus co-infiziert <sup>49</sup>.

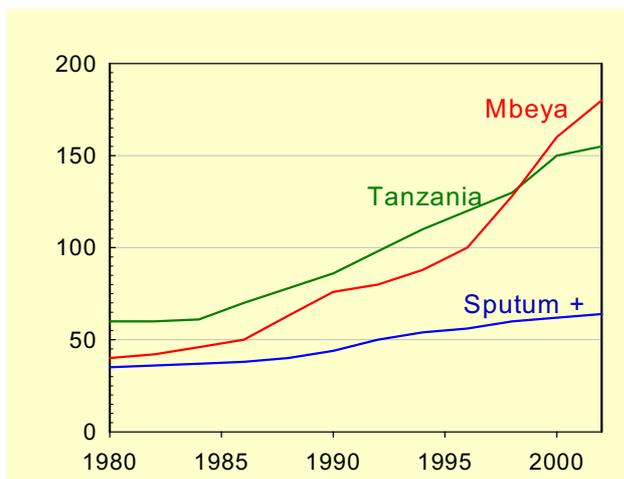


Abbildung 4: TB-Melderate pro 100.000 in Mbeya, Tanzania (aus Hölscher<sup>49</sup>)

**2.1.3 Gesundheitspolitische Bedeutung (Public Health)**

Heute sieht man die Gründe für die Zunahme der Tuberkulose in der vernachlässigten Gesundheitspolitik vor allem in den Entwicklungsländern, der Armut, der Migration, dem Bevölkerungswachstum, der HIV-Epidemie und in inadäquat konzipierten Kontrollprogrammen. Die Umsetzung international empfohlener Programme ist oft in den am stärksten betroffenen Ländern mangelhaft. 95% aller TB-Fälle und 98% aller Todesfälle durch TB ereignen sich in den Ländern, die über die wenigsten Ressourcen verfügen<sup>5</sup>.

Im gesundheitspolitischen Kontext hat der Begriff der „Burden of disease“, als Maß für durch Tod oder Krankheit verlorene Jahre (DALYS=Dissability Adjusted Life Years) eine große Bedeutung erlangt. Die Krankheitslast berücksichtigt dabei sowohl die Mortalität als auch die Morbidität und vergleicht sie mit der Lebenserwartung eines Gesunden<sup>4</sup>. Es wird davon ausgegangen, dass die Tuberkulose in der Rangfolge der Krankheiten mit der höchsten Krankheitslast 2030 den gleichen Rang (n=10) wie im Jahr 2002 einnehmen wird <sup>65</sup>. Die Krankheitslast der Tuberkulose muss im sozialen wie wirtschaftlichen Zusammenhang als eine Bürde im Entwicklungsprozess stark betroffener Länder gesehen werden. Die Krankheit betrifft oft junge Erwachsene, die einen großen Anteil an der Wirtschaft einer Gesellschaft haben<sup>15</sup>. In Afrika ist die am meisten betroffene Gruppe die der 25-34 Jahre alten Männer (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Alters- und Geschlechtsverteilung der gemeldeten und diagnostizierten (pos. Ausstrich) TB-Fälle in Afrika (aus WHO report 2009<sup>9,10</sup>)

	0-14	15-24	25-34	35-44	45-54	55-64	65+
Männlich	7 653	54 179	96 884	71 030	43 074	20 597	12 850
Weiblich	10 102	56 594	77 008	43 857	24 129	12 281	7 431

**2.2 Mikrobiologie, Pathogenese, Klinik, Prävention und Therapie**

**2.2.1 Erreger**

Die Erreger der menschlichen Tuberkulose sind Mycobacterium tuberculosis, M. bovis, M. africanum, M. microti und M. canetti, zusammengefasst unter dem Begriff Mycobacterium tuberculosis complex. Die Zellwand der Mykobakterien zeichnet sich durch einen hohen Anteil an Glykolipiden und Wachsen aus, was zur schlechten Anfärbbarkeit, zu langsamen Wachstum, Unempfindlichkeit gegenüber chemischen und physikalischen Noxen und zur Diffusionsbarriere für Antibiotika führt.

Mykobakterien sind aerob, unbeweglich und nicht Sporen bildend. Da die Tuberkuloseerreger langsam wachsen und keinen Farbstoff bilden, werden sie in die Runyon-Gruppe III klassifiziert (Zusammenfassung des Kapitels „Mykobakterien“ aus „Medizinische Mikrobiologie“<sup>46</sup>).

### **2.2.2 Übertragungswege und Infektiosität**

Laut „Principles and Practice of Infectious Diseases“<sup>32</sup> ist die Infektion mit *Mycobacterium bovis* über kontaminierte unbehandelte Milch möglich. Kutane Infektionen sind vor allem bei medizinischem Personal beschrieben worden. Es gibt auch Berichte über eine Ansteckung auf dem Blutweg. Die meisten Infektionen ereignen sich jedoch über infektiöses Sekret aus der Lunge von TB-Patienten, die beim Abhusten aerolisiert werden und eingeatmet werden können. Bei einmaligem Hustenstoß können bis zu 3000 sogenannter *droplet nuclei* entstehen; so viele wie bei einem fünfminütigen Gespräch.

Die Nähe und Intensität des Kontakts und die Infektiosität der Quelle bestimmen das Risiko der Ansteckung. Patienten mit positivem Ausstrich als Anhalt für einen leicht zu führenden Nachweis der Mykobakterien sind ansteckender als Patienten mit nur positivem kulturellem Nachweis. Haushaltskontakte mit Tuberkulosepatienten führen in fünf bis fünfzig Prozent der Fälle zu einer Ansteckung.

### **2.2.3 Pathogenese**

Die Aussagen der Kapitel „Pathogenese“ und „Klinik“ basieren auf aktuellen Lehrbüchern<sup>23,37,80</sup>.

Demnach entgeht *Mycobacterium tuberculosis* den humoralen Abwehrmechanismen durch ein Persistieren in mononukleären Phagozyten. Der Organismus des Infizierten bekämpft die Tuberkulose mit der typischen Granulombildung, die sich abhängig von der Inokulationsdosis und der Immunkompetenz des Infizierten in zwei Reaktionsformen zeigen kann.

Bei der exsudativ-käsigen Reaktion führt die gewebetoxische Komponente der Tuberkelbakterien zur gelatinösen Herdpneumonie mit einer exsudativen Entzündungsreaktion, die durch die nach Wochen einsetzende Überempfindlichkeitsreaktion Typ IV in eine käsige Bronchopneumonie mit verkäsenden Nekrosen übergeht. Die Typ-IV-Reaktion nach Coombs und Gell besteht bei der Tuberkulose im Sinne einer Infektallergie aus einem durch Antigen-Exposition ausgelösten perivaskulären Infiltrat an Helferlymphozyten.

Die Lymphozyten locken Makrophagen ins Entzündungsgebiet, die versuchen, das Antigen zu bekämpfen. Gelingt dies nicht, wandeln sie sich in Epitheloidzellen und bilden ein Granulom um die Erreger, das fibrotisch ummauert wird. Gelingt es Epitheloidzellen und Makrophagen den Erreger zu vernichten, verkalkt der Entzündungsherd und heilt ab. Wenn sich die Nekrose ausdehnt, einen Bronchus arrodirt, abgehustet wird und einen Hohlraum hinterlässt, so spricht man von tuberkulöser Kavernenbildung.

Die proliferativ-produktive Reaktion beruht auf der Ausbildung zellgebundener Immunitätsmechanismen innerhalb von mehreren Wochen. Die nun reduzierte Keimzahl wird durch die Bildung von Granulomen an einer weiteren Streuung gehindert. Ein Tuberkulom entsteht, wenn der Entzündungsherd auf hämatogenem Weg entstanden ist. Dieser Rundherd kann in seiner vernarbten und verkalkten Bindegewebskapsel virulente Erreger enthalten, die beim Fortschreiten der verkäsigen Nekrose Anschluss an einen Bronchus erhalten und somit eine bronchogene und letztlich generalisierte Streuung bewirken können. Azinös-nodöse Streuherde entstehen aus den bronchogenen Entzündungsherden, den Kavernen. Heilen sie ab, entsteht die zirrhotische Lungentuberkulose, bei der die Kavernen zwar vernarben, aber offen bleiben und durch Streuung azinös-nodöse Streuherde erzeugen.<sup>23,37,80</sup>

#### **2.2.4 Klinik**

Die Klinik der Tuberkulose wird in drei Stadien eingeteilt: Primäraffekt-tuberkulose, hämatogene Generalisation und Postprimärtuberkulose mit Organtuberkulose.

Bei der Erstinfektion, die meist klinisch stumm verläuft, entsteht in über 90 Prozent ein Primärherd in der Lunge, selten in den Tonsillen oder im Gastrointestinaltrakt<sup>93</sup>. Da in den ersten Wochen noch die zellvermittelte Immunreaktion fehlt, kommt es zur exsudativen Entzündungsreaktion und damit erst zur gelatinösen, später zur käsigen Bronchopneumonie. Die Erreger und damit auch der Primärherd finden sich meist im oberen Lungengeschoss. Durch lymphogenen Abtransport der Erreger in die Hiluslymphknoten entsteht eine käsige Lymphadenitis. Man spricht auch vom Primärkomplex, ein Begriff, der Primärherd und Befall der Lymphknoten einschließt. Primärherd und befallene Lymphknoten heilen oft unter Granulombildung innerhalb eines Jahres ab, werden bindegewebig abgekapselt und verkalken. In den tuberkulösen

Kalkherden und Tuberkulomen können sich aber noch Tuberkelbakterien befinden.

Die hämatogene Generalisation geht entweder von den befallenen Lymphknoten des Primärkomplexes, einer reaktivierten Hiluslymphknotentuberkulose oder von einer Organtuberkulose aus. Hierbei kommt es entweder lymphogen oder durch Arodierung von Gefäßen zu einer Verschleppung der Mykobakterien ins Blut. Folge der systemischen Ausbreitung können die sehr akuten Krankheitsbilder der Landouzy-Sepsis und der Meningitis tuberculosa sein. Die individuelle Abwehrlage bestimmt, ob es zu einem Befall vieler Organe kommt oder ob vor allem die Lunge befallen wird. Beim lokalisierten Lungenbefall siedeln sich die Mykobakterien in apikalen pulmonalen Bereichen an (Simon-Spitzenherde) und können bei guter Immunität abheilen. Sie können aber auch im Tertiärstadium zur bronchogenen Streuung führen. Bei der miliaren Form sind die Lungen und möglicherweise andere Organe durchsetzt mit kleinen verkäsenden Herden oder Granulomen.

Nach einer Reaktivierung alter Streuherde, einer Superinfektion noch nicht abgeheilter Läsionen oder nach einer Reinfektion kommt es zum Bild der Postprimären-Tbc oder chronischen Tbc, die zur Parenchymzerstörung führt.

Die Primärherdphthise führt durch eine bronchogene Streuung aus einer Primärherdkaverne zu einer rasch progredienten „galoppierenden Schwindsucht“, die innerhalb von Monaten zum Tode führt.

Wird im Primär- oder Sekundärstadium ein Bronchusast arrodirt, folgt eine knotig-ulzeröse Entzündung der Bronchialschleimhaut.

Durch exogenen Reinfekt oder durch bronchogene Streuung des Simon-Spitzenherdes kommt es zum infraklavikulären Frühinfiltrat, das nach Einschmelzung und Abhusten zur Frühkaverne werden kann.

Auch ein Primärherd oder ein Simon-Spitzenherd können direkt zu Frühkavernen werden, die mit einem ableitenden Bronchus in Verbindung stehen und damit eine „offene“ Tuberkulose auslösen. Wenn die Kaverne Anschluss an Gefäße findet, kann das einen Bluthusten auslösen.

Bei Chronifizierung verkalkt die Kaverne im Laufe der Zeit und die umgebenden Gefäße obliterieren. Ist dies nicht der Fall, kann ein Aneurysma entstehen, das durch starken Husten rupturieren und zum Blutsturz führen kann.

Bei Streuung aus einer Kaverne kann es bei guter Resistenz zur Bildung azinös-nodöser Herde kommen, die abheilen.

Die extrapulmonale Tuberkulose kann prinzipiell jedes Organ betreffen und entweder aus einer Lungentuberkulose entstehen oder – weitaus seltener – eine Primärläsion darstellen. Kleinkinder und immungeschwächte Patienten sind besonders davon betroffen. An den Lymphknoten, besonders am Hals (früher Scrofula genannt), gibt sie Hinweis auf eine Infektion mit *Mycobacterium bovis*. Eine Nierenbeteiligung tritt oft erst nach Jahren auf. Im Besonderen können noch betroffen sein: Nebenniere, Zentrales Nervensystem, Knochen und Gelenke, Darm, Leber, Haut und Schleimhäute, Pleura, Perikard, Peritoneum, der Urogenitaltrakt und die Tonsillen.<sup>23,37,80</sup>

### **2.2.5 Prävention**

#### **Impfung**

Die BCG (Bacille Calmette-Guérin)-Impfung wird seit 1998 von der Ständigen Impfkommission am Robert Koch-Institut (STIKO) nicht mehr empfohlen.<sup>69</sup> Sie wurde erstmals 1921 angewandt und basiert auf dem Bacille Calmette-Guérin, einem attenuierten *Mycobacterium bovis*.<sup>18</sup> Während die Impfung bei Kindern gegen tuberkulöse Meningitis und Miliartuberkulose schützt, bringt sie bei Erwachsenen höchstens einen 70%-igen Schutz<sup>23,95</sup>. Neue Hypothesen gehen davon aus, dass eine überschießende Th1-Antwort in der Lunge, ausgelöst durch *M. tuberculosis* selbst und durch die Impfung geboostert, in Kombination mit einem Fehlen bzw. einem Missverhältnis von T-regulierenden Zellen, zu der fehlenden Immunität bei Erwachsenen führt<sup>35</sup>. Neue sich in Entwicklung befindende Vakzine haben die Aufgabe eine starke Th1-Antwort auszulösen. Allerdings darf diese Th1-Antwort nicht zur Immunpathologie der Kavernenbildung in den Lungen führen und muss durch das Vorhandensein einer adäquaten Aktivität an regulierenden T-Zellen die Balance zur Th2-Antwort erhalten.

#### **Chemoprophylaxe**

Die gebräuchlichste Substanz zur Chemoprophylaxe – also nach Ausschluss einer aktiven Tuberkulose – stellt Isoniazid dar, das in einer Dosis von 3-5 mg/kg für einen Zeitraum von sechs Monaten verabreicht wird. Dabei muss davon auszugehen sein, dass bei der Infektionsquelle keine Resistenz gegen Isoniazid vorliegt<sup>69</sup>. Laut eines Reviews der Cochrane Collaboration<sup>85</sup> beträgt durch die Chemoprophylaxe mit Isoniazid die Risikoreduktion für die Entwicklung einer

aktiven Tuberkulose 60 Prozent. Entsprechend dieser Statistik beträgt die Zahl der zu behandelnden Personen, die notwendig ist, um eine Infektion zu vermeiden (Number Needed to Treat) 35 und die durch die Hepatotoxizität von Isoniazid bedingte Zahl von Erkrankungen, die durch das Medikament verursacht werden (Number Needed to Harm) 200 behandelte Personen. Es gibt keine relevanten Unterschiede in Studien mit Überprüfung einer sechsmonatigen und einer zwölfmonatigen Prophylaxegabe. Allerdings bemängeln die Autoren des Reviews, dass seit 1994 keine Studien mehr zur Wirksamkeit von INH durchgeführt worden sind. Während INH als Monotherapie das Mittel der ersten Wahl darstellt, können alternativ auch Rifampicin, Ethambutol und Pyrazinamid in Zweifachkombination zur Prophylaxe verwendet werden.<sup>69</sup>

## 2.2.6 Therapie

### Standardtherapie

Die Standardtherapie besteht aus einer zweimonatigen Initialphase, in der eine Vierfachkombination aus Isoniazid, Rifampizin, Pyrazinamid und Ethambutol verabreicht wird, und einer vier- bis sechsmonatigen Konsolidierungsphase, in der mit einer Zweifachkombination behandelt wird (siehe Tabelle 3)<sup>47</sup>.

Tabelle 3: Standardtherapie der Tuberkulose in Initial- und Konsolidierungsphase (aus Herzog<sup>47</sup>)

Initialphase	(2 Monate)
Isoniazid	5mg/kg/Tag (max. Dosis 300mg/Tag)
Rifampicin	10mg/kg/Tag (max. Dosis 600mg/Tag)
Pyrazinamid	30mg/kg/Tag (max. Dosis 2g/Tag)
Ethambutol	15-25mg/kg/Tag (max. Dosis 2g/Tag)

Konsolidierungsphase	(4-6 Monate)
Isoniazid plus Rifampizin oder Isoniazid plus Rifampizin	täglich, wie oben  2mal wtl. 14mg/kg (max.Dosis 1g/Tag)  2mal wtl. 10mg/kg (max Dosis 600mg/Tag) <sup>47</sup>

### Therapie der Tuberkulose bei Arzneimittel-Resistenz

Die durch Spontanmutationen bedingte Resistenz der Mykobakterien gegenüber Medikamenten kann auftreten, wenn in Kavernen bei pulmonaler Tuberkulose eine große Population an Tuberkelbazillen vorhanden ist, ein falsches Behandlungsregime angewendet wird oder die Einhaltung des Therapieplanes vom Patienten nicht richtig befolgt bzw. vom Arzt nicht intensiv kontrolliert wird. Bei einer Resistenz sowohl gegen Rifampizin als auch gegen Isoniazid spricht man von Multiple Drug Resistance Tuberculosis (MDR-TB), die im Vergleich zur alleinigen Rifampicin-Resistenz eine schlechtere Prognose aufweist.<sup>20</sup> Die Behandlung richtet sich nach der Resistenz und setzt sogenannte Second-Line Drugs (SDL) ein, beispielsweise Ethionamid, Cycloserin, Amikacin, Kanamycin, Capreomycin oder p-Aminosalicylsäure. Mögliche Behandlungskonzepte sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Therapie der Tuberkulose bei Arzneimittelresistenz (nach Treatment of Tuberculosis, CDC<sup>20</sup>)

Resistenz gegen	Alternativtherapie	Dauer der Behandlung (Monate)
INH (± SM)	RIF, PZA, EMB (+ FQN bei ausgeprägter Krankheit)	6
INH und RIF (±SM)	FQN, PZA, EMB, IW, ± alternativer Wirkstoff	18-24
INH, RIF (±SM) und EMB oder PZA	FQN (EMB oder PZA falls wirksam), IW und zwei alternative Wirkstoffe	24
RIF	INH, PZA, EMB (+ FQN bei ausgeprägter Krankheit)	9-12

Abkürzungen: EMB= Ethambutol, FQN= Fluorquinolon, IW=injizierbarer Wirkstoff, INH=Isoniazid, PZA=Pyrazinamid, RIF=Rifampicin, SM=Streptomycin  
 FQN, beispielsweise Ofloxacin, Levofloxacin, Ciprofloxacin  
 IW, injizierbare Wirkstoffe: Aminoglykoside (Streptomycin, Amikacin, Kanamycin) oder das Polypeptid Capreomycin  
 Alternative Wirkstoffe: Ethionamid, Cycloserin, p-Aminosalicylsäure, Clarithromycin, Amoxicillin/Clavulansäure, Linezolid

Etwa ab dem Jahr 2000 sind Fälle von Extremely Drug Resistant TB (XDR-TB) bekannt, die sich durch Resistenz gegen Rifampicin und Isoniazid und gegen ein Fluorquinolon und mindestens eines der injizierbaren Second-Line Drugs

(Capreomycin, Kanamycin oder Amikacin) auszeichnen<sup>11</sup>. Eine Erhebung des Center of Disease Control und der WHO umfasst 17690 TB-Isolate aus den Jahren 2000 bis 2004, von denen sich 2 Prozent als resistent gegenüber Second Line Drugs erwiesen haben<sup>3</sup>. Eine Ausbreitung der XDR-Tb ohne neue Therapieoptionen gefährdet somit die Kontrolle der Tuberkulose.

### **2.3 Spezielle Aspekte der HIV/TB – Co-Infektion**

Die gleichzeitige Infektion mit Human Immunodeficiency Virus und Tuberkulosebakterien bildet eine Kombination, die die Therapie erschwert und die Prognose verschlechtert. Während Patienten, die nur mit Mykobakterien infiziert sind, ein Lebenszeitrisko für den Ausbruch der Tuberkulose von 10-20 % haben, kann bei HIV/TB-Coinfizierten das jährliche Risiko für die Erkrankung über 10% betragen. Die Tuberkulose ist in Entwicklungsländern die häufigste Todesursache unter HIV-Infizierten und weltweit eine der wichtigsten opportunistischen Krankheiten von AIDS überhaupt<sup>29</sup>.

Während die Todesrate durch TB global gesehen bei HIV-negativen Patienten von 1990 bis 2002 um 20 Prozent zurückging, ging sie in den afrikanischen Ländern südlich der Sahara – der Region mit der höchsten HIV-Prävalenz – in dieser Zeit nur um 10 Prozent zurück. In afrikanischen Ländern, in denen die HIV-Prävalenz unter den 15-49-Jährigen über vier Prozent beträgt, konnte ein Anstieg der TB-Inzidenz bei HIV-Negativen im Vergleich zwischen 1990 und 2002 von 150 Prozent festgestellt werden<sup>65</sup>. Dies macht deutlich, dass die HIV/TB-Co-Infektionen im Sinne eines großen Reservoirs an Mykobakterien auch einen Einfluss auf die Verbreitung der Tuberkulose unter der HIV-negativen Bevölkerung im Sinne einer höheren Erkrankungsrate haben.

Eine im ländlichen Südafrika zwischen Januar 2005 und März 2006 durchgeführte Studie<sup>42</sup> findet unter 542 bestätigten Tuberkulosefällen 221 Fälle von MDR-TB und 53 Fälle von XDR-TB. 98 Prozent der Patienten mit XDR-TB starben. Alle Getesteten (n=44) waren HIV-positiv. Die mittlere Überlebenszeit nach Probengewinnung hat 16 Tage betragen. Bei zwei Dritteln der Patienten gibt es Hinweise auf eine nosokomiale Infektion. Die Studie zeigt die relativ hohe Verbreitung der resistenten Formen der Tuberkulose, den Zusammenhang zwischen HIV-Status und XDR-TB und die schnelle Progression bei einer Coinfektion.

In Abbildung 5 wird der Zusammenhang zwischen der Verbreitung von Tuberkulose und HIV ersichtlich. Die höchsten Co-Infektionsraten finden sich in

afrikanischen Ländern südlich der Sahara. Abbildung 6 zeigt die direkt proportionale Beziehung zwischen HIV-Prävalenz und positiven Sputumergebnissen auf säurefeste Bakterien.

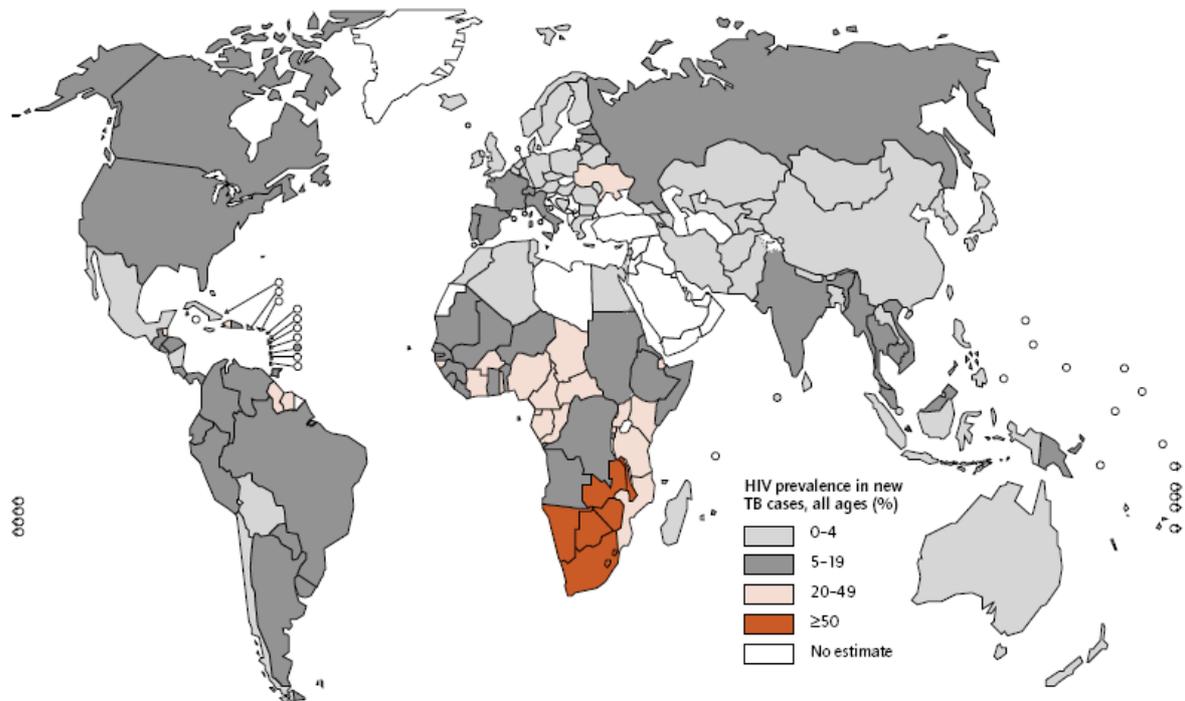


Abbildung 5: Weltweites Vorkommen von HIV unter Tuberkulosepatienten 2007 (aus WHO Report 2009<sup>10</sup>)

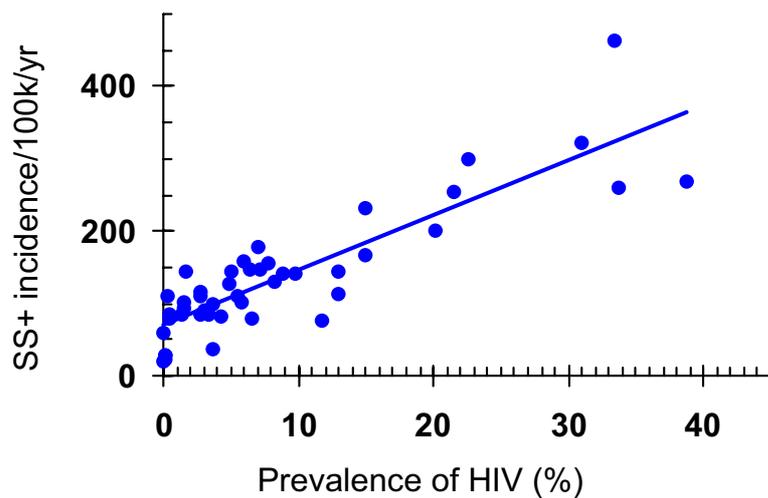


Abbildung 6: Korrelation der HIV-Prävalenz zur Tuberkuloseinzidenz pro 100.000/Jahr, SS+=positiver Sputumausstrich (aus Williams<sup>98</sup>)

Einem Anstieg der HIV-Prävalenz in Nairobi folgt sechs Jahre später ein Anstieg der registrierten Fälle von Tuberkulose (siehe Abb. 7).

In afrikanischen Ländern mit hoher HIV-Prävalenz sinkt seit 2004 zwar die jährliche Inzidenzrate, die absolute Zahl der Neuerkrankungen pro Jahr bleibt jedoch weiterhin auf einem sehr hohen Niveau. (siehe Abb. 8).

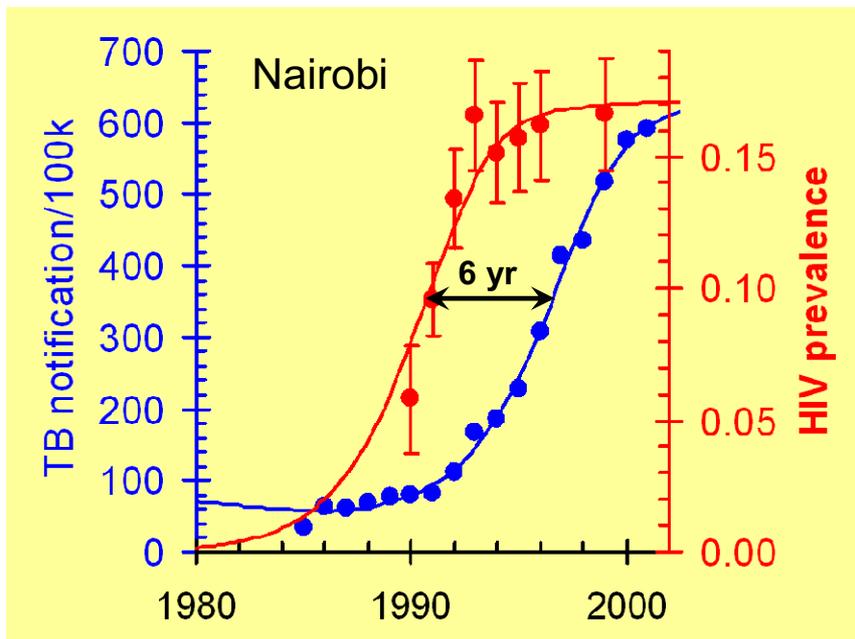


Abbildung 7: Zeitlicher Verlauf von HIV-Prävalenz und der registrierten TB-Fälle pro 100.000 in Nairobi (aus Williams<sup>98</sup>)

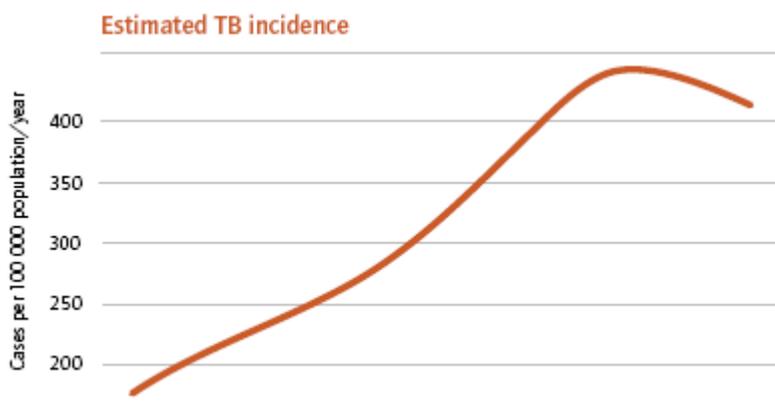


Abbildung 8: Verlauf der Inzidenzrate in afrikanischen Ländern mit hoher HIV-Prävalenz 1990 bis 2007 (aus WHO report 2009<sup>9</sup>)

Die gleichzeitige Infektion mit HI-Viren und Tuberkelbakterien bringt aber nicht nur Probleme in Therapie und Prognose, sondern verändert auch die Pathologie und erschwert die Diagnostik. Die extrapulmonale Form nimmt zu, je geringer die CD4-Zellzahl bei HIV-Infizierten ist<sup>55</sup>. Es wird vermutet, dass das geschwächte Immunsystem von HIV-Patienten nicht in der Lage ist, die Mykobakterien einzudämmen, was zur hämatogenen Dissemination und daraus folgend zur Beteiligung einzelner oder mehrerer extrapulmonaler Organe führt<sup>1</sup>.

Die Probleme bei der Diagnostik im Falle einer HIV/TB-Coinfektion werden im nächsten Kapitel abgehandelt.

## **2.4 Diagnostik der Tuberkulose**

### **2.4.1 Zur Verfügung stehende Diagnostik**

An dieser Stelle wird auf die etablierte Diagnostik der Tuberkulose eingegangen<sup>23,37,46</sup>, die sich aus klinischen Befunden, Ziehl-Neelsen-Färbung, Tuberkulintest und Bakterienkulturen zusammensetzt. Neuere Ansätze finden sich unter dem Kapitel „Stand der Forschung“ (2.4.4).

Ein Anfangsverdacht auf eine Infektion mit Tuberkelbakterien muss - vor allem in Endemiegebieten – bereits bei jeder Art von Lungenerkrankung geäußert werden. Ebenfalls soll an Tuberkulose gedacht werden bei Zeichen der Lymphadenitis, besonders der Halslymphknoten. Die primäre Infektion zeigt sich oft mit grippalen Symptomen. Die anamnestischen Angaben und klinischen Symptome wie Husten, Gewichtsverlust, Müdigkeit, Temperaturerhöhung, trockene oder feuchte Rasselgeräusche bei der Lungenauskultation sind allerdings zu unspezifisch, um sich auf die Diagnose „Tuberkulose“ festlegen zu können. Selbst eine Meningitis tuberculosa zeigt sich bis auf intensiver werdende Kopfschmerzen viel weniger dramatisch als die typische Symptomatik bei Hirnhautentzündung.

Ein nächster Schritt in der Diagnostik stellt die Anfärbung des Sputums des Patienten und die Betrachtung unter dem Mikroskop dar (siehe Abb. 9). Nach einer Anreicherung durch Zentrifugation werden die Bakterien nach Ziehl-Neelsen, Kinyoun oder mit Auramin-Rhodanid gefärbt. Die Reagenzien für die Färbung nach Ziehl-Neelsen sind Karbol-fuchsinlösung, Salzsäurealkohol und Methylenblaulösung. Typisch für die Mykobakterien mit ihrem hohen Lipidanteil in der Zellwand ist, dass sie nach der Färbung nicht mehr mit Salzsäurealkohol entfärbt werden können. Mikroskopisch lässt sich lediglich eine Aussage treffen, ob säurefeste Bakterien vorhanden sind. Sind diese nicht zu sehen, kann jedoch eine Tuberkulose nicht ausgeschlossen werden.



**Abbildung 9: Säurefeste Stäbchen (Tuberkelbakterien) in Ziehl-Neelsen Färbung (mit Pfeil markiert).**  
Quelle: Wikipedia, [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/56/TB\\_AFB\\_smear.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/56/TB_AFB_smear.jpg)

Ein weiteres diagnostisches Mittel besteht im Tuberkulintest (Mantoux oder Tine), einer Suspension von hitzeinaktivierten Mykobakterienproteinen, die intrakutan injiziert oder eingeritzt wird. Hat der Patient bereits eine Infektion mit den Tuberkelbakterien gehabt, so hat er nach ein paar Wochen eine zelluläre Antwort im Sinne einer Hypersensibilität vom verzögerten Typ ausgebildet, die sich im Falle des Tuberkulintests in einer Hautrötung und Induration um die Einstichstelle zeigt. Der Test wird frühestens 72 Stunden nach Injektion abgelesen. Eindeutige Aussagen können nur bei negativem Test an immunkompetenten HIV-negativen Patienten gemacht werden. Ein positiver Test kann durch eine ausgeheilte Tuberkulose, eine Impfung und eine latente oder akute Tuberkulose ausgelöst werden.

Nach positivem Tuberkulintest erfolgt in der Regel die radiologische Diagnostik. Auf dem Röntgenbild können der Primärherd mit befallenen Hiluslymphknoten (Primärkomplex), die Kalkablagerungen der Kavernen, Verschattungen großer Tbc-Herde oder diffuse Verschattungen bei Miliartuberkulose zu sehen sein.

Die Kultivierung der Bakterien geschieht nach einer Probenvorbereitung auf Löwenstein-Jensen-Agar oder Middlebrook-Medien und dauert zwischen zwei und vier Wochen. Die kulturelle Anzucht der Mykobakterien ist aus verschiedenen Proben möglich, darunter Sputum, Bronchiallavage-Flüssigkeit, Blut, Liquor und Urin. Sie ist wichtig in der Resistenzbestimmung von Medikamenten und hat die niedrigste Nachweisgrenze bei 10 Bakterien pro Milliliter Material. Die Sensitivität liegt zwischen 80 und 85%, bei einer Spezifität von ungefähr 98%<sup>1</sup>. Damit gilt der kulturelle Nachweis oft als „Goldstandard“ in der Diagnostik der Tuberkulose

<sup>51</sup>.

Tierversuche mit Meerschweinchen werden nur in Ausnahmefällen durchgeführt.

Beim radiometrischen Verfahren Bactec setzen die in einer Bouillon wachsenden Mykobakterien radioaktiv markierten Kohlenstoff frei, der gemessen werden kann.

Die Amplifizierung spezifischer Gensequenzen aus Sputum und anderen Proben und andere neuere Methoden werden unter 2.4.4 besprochen.

Die wichtigsten TB-Diagnostika, Sputumausstrich, Kultur und die molekularen Nachweisverfahren unterscheiden sich prinzipiell auch in ihrer Nachweisgrenze bezogen auf die Anzahl an Bacillen pro Volumen gewonnener Probe. So benötigt man für die Diagnose säurefester Bakterien unter dem Mikroskop 5000 bis 10000 Tuberkel pro ml<sup>31,99</sup>, für die verschiedenen Arten an Kulturen 10 bis 100 Bacillen pro ml<sup>31</sup> und bei molekularen Amplifikationstechniken etwa 10 Bacillen pro ml Probe<sup>1</sup>.

#### **2.4.2 Diagnostik in den Tropen**

Die diagnostischen Möglichkeiten in den Tropen sind nicht einheitlich. In großen Städten sowie in Universitätskrankenhäusern sind teilweise ähnlich hohe Standards wie in Deutschland anzutreffen. Nachdem aber oft kein vergleichbares Krankenversicherungssystem besteht, können sich nur wenige Patienten aufwendige und kostenintensive Untersuchungen leisten. In peripher gelegenen Einrichtungen der Gesundheitsversorgung, manchmal nur von medizinischem Hilfspersonal geführten Ambulanzen, sogenannten „Health posts“, ist das Material und der Nachschub für komplizierte Diagnostik nicht vorhanden. Die am weitesten verbreitete und am häufigsten durchgeführte Tuberkulosediagnostik in den Tropen ist demnach die Betrachtung des Sputumausstrichs unter dem Mikroskop nach Ziehl-Neelsen-Färbung.<sup>37</sup>

#### **2.4.3 Probleme in der Diagnostik**

Es soll hier noch einmal genauer auf die Limitationen der etablierten klassischen Diagnostikmethoden eingegangen werden.

Wie bereits oben erwähnt, lassen klinische Befunde in der Regel keine spezifische Diagnose zu. Es kann sich besonders bei HIV-Patienten auch um atypische Mykobakterien-Infektionen oder Infektionen mit anderen Erregern handeln.

Der intradermale Tuberkulin Hauttest (Mantoux) besitzt nur eine geringe Spezifität und Sensitivität, vor allem in Gebieten, in denen TB endemisch ist, da in Afrika rund 70% aller Menschen eine zelluläre Immunantwort gegen das PPD (purified protein derivate) des Tests aufzeigen<sup>91</sup>. Die geringe Sensitivität drückt sich aus in vermehrt falsch-negativen Ergebnissen bei Immunsupprimierten. In

einer Studie in Zambia hatten 43% der HIV-positiven Patienten einen falsch-negativen Tuberkulintest<sup>38</sup>. Durch die hohe Zahl an HIV-TB-Coinfizierten verliert der Test dadurch seine Bedeutung und wird bei HIV-Infizierten sogar ausdrücklich nicht empfohlen<sup>79</sup>. Die weit verbreitete Impfung mit dem Bazillus Calmette-Guèrin, die mehr als drei Milliarden Menschen erhalten haben, begründet die geringe Spezifität des Hauttests. Die Impfung enthält über 200 Antigene, die mit den Mykobakterien des Mycobacterium tuberculosis complex identisch sind und löst damit bis zu 15 Jahre nach Vakzinierung ein falsch-positives Testergebnis aus<sup>79</sup>. Außerdem erlaubt der Nachweis einer Immunreaktion nach Kontakt mit Mykobakterien noch keine Aussage über einen Ausbruch der Krankheit.

Die Sputummikroskopie nach Anfärbung als die am weitesten verbreitete Diagnostikmethode ist insensitiv. Sie funktioniert am besten im fortgeschrittenen Stadium der Krankheit, schneidet aber bei HIV-Infizierten schlecht ab und ist inadequat bei Kindern und bei extrapulmonaler Tuberkulose<sup>74</sup>. Small und Perkins bemängeln, dass bei der Diagnose eines der weltgrößten Public-Health Probleme immer noch auf die antiquierte Methode aus dem 19. Jahrhundert vertraut werde<sup>84</sup>. Ein Blick auf Tabelle 5 mit der großen Zahl negativer Sputumausstriche bei pulmonaler Tuberkulose und die große Zahl an extrapulmonaler Tuberkulose zeigt den hohen Anteil falsch-negativer Ausstrichbefunde.

Tabelle 5: Angaben zur Diagnostik gemeldeter TB-Fälle 2007 (aus WHO Report 2009<sup>9</sup>), Zahlen bezogen nicht auf geschätzte, sondern gemeldete Fälle

	Global	Afrika	Tansania
Gemeldete Fälle (neu+Rezidiv)	6 067 545	1 326 692	62 092
Positive Sputumausstriche neuer pulmonaler Fälle	2 580 700	561 149	24 520
Negative oder unbekannte Sputumausstriche neuer pulmonaler Fälle	1 937 466	408 964	20 521
Kultur oder Sputum bestätigte neue pulm. Fälle	2 759 521	668 500	45 041
Anteil positiven Sputumnachweises an neuen Fällen und Rezidiven in Prozent	57	45	41
Anteil extrapulmonaler Tuberkulose an neuen Fällen und Rezidiven in Prozent	14	18	21

Die Mikroskopie des Sputumausstrichs benötigt 5000 bis 10000 Organismen/ml und kann somit die paucibazillären Formen nicht detektieren. Es können nur semi-quantitative Aussagen über die Zahl der säurefesten Stäbchen gemacht werden <sup>1</sup>.

Während sich zu Beginn einer HIV-Infektion in radiologischen Bildern typische Zeichen einer TB-Infektion finden lassen, fällt in fortgeschrittenen Stadien eine Kavernenbildung häufig nicht auf. Diffuse Infiltrate und eine intrathorakale Adenopathie sind häufig erkennbar, jedoch unspezifisch <sup>1</sup>.

Das Problem der Kultivierung der Mykobakterien liegt in der mehrere Wochen dauernden Wartezeit auf ein Ergebnis <sup>51</sup>. Außerdem können nur semi-quantitative Aussagen gemacht werden.

Zusammenfassend kann man Anforderungen für einen neuen „idealen“ Diagnostiktest für Tuberkulose wie folgt beschreiben:

bessere Sensitivität als die Mikroskopie;

Feldtauglichkeit (Entwicklungsländer);

Ergebnis unabhängig vom HIV-Status;

Möglichkeit der Diagnose sputumnegativer TB;

Möglichkeit der Diagnose extrapulmonaler TB<sup>49</sup>;

Möglichkeit zur Bestimmung der Bacterial Load (quantitative Angabe zu vorhandenen Bakterien).

Viele Wissenschaftler fordern bessere Diagnostikmethoden für die Tuberkulose <sup>71,101</sup>. Auch die WHO forciert die Entwicklung neuer Tests und hebt in diesem Zusammenhang auch das enorme wirtschaftliche Potential eines solchen Tests hervor <sup>2</sup>.

#### **2.4.4 Stand der Forschung**

Neuere Erkenntnisse über die genetische Struktur des Tuberkelbacillus haben in letzter Zeit dazu beigetragen, dass neue molekulare Methoden zum Nachweis und zur Identifizierung von *Mycobacterium tuberculosis* aus menschlichen Proben entwickelt wurden.

### **T-cell interferon-gamma release assays**

Die zugelassenen und kommerziell erhältlichen Tests QuantiFERON-TB-Gold® (Cellestis Limited, Carnegie, Australia) und T Spot-TB® (Oxford Immunotec, Oxon, UK) messen die nach Antigenstimulation von T-Zellen ausgelöste Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) Produktion im Blut. Als Antigene eingesetzt werden nicht wie beim Tuberkulintest „purified protein derivate“ (PPD), sondern die für *M. tuberculosis* hochspezifischen Antigene „Early secretory antigenic target 6“ (ESAT-6) und „Culture filtrate protein“ (CFP-10). Sie sind nicht Bestandteil der BCG-Impfung und damit kann je nach Höhe der gemessenen Immunantwort eine latente TB-Infektion von einer aktiven Tuberkulose unterschieden werden. Während es sich bei QuantiFERON-TB-Gold um einen Enzyme linked immuno assay (ELISA) handelt, der die IFN- $\gamma$ -Konzentration bestimmen kann, benutzt der T Spot-TB® die Technik des enzyme linked immunospot (ELISPOT) zur Bestimmung der Anzahl IFN- $\gamma$  sezernierender T-Zellen<sup>28,72</sup>. Dheda et al<sup>33</sup> bewerten in einer Metaanalyse die Sensitivität des QuantiFERON-TB Gold assays im Vergleich zum konventionellen Hauttest in Gebieten mit hoher und niedriger Tuberkuloseprävalenz. In dieser Arbeit wird der QuantiFERON-TB Gold Assay stellvertretend als Referenz für Interferon- $\gamma$  release assays (IGRAs) verwendet, da hierzu die meisten Studien vorhanden sind. Es zeigt sich für die latente Tuberkulose eine aus den eingeschlossenen Studien gepoolte Sensitivität für die ausgewählte IGRA-Methode von 69 % in Gebieten mit hoher TB-Prävalenz und von 83 % in Gebieten mit niedriger TB-Prävalenz. Eine Erklärung für die schlechtere Sensitivität bei höherer Durchseuchung wird beispielsweise in der hohen HIV-Coinfektionsrate, Unterernährung, fortgeschrittenen Krankheitsverläufen und wiederholten Kontakten mit TB in Regionen mit hoher Krankheitslast gesehen. Vorteile des IGRA-Tests gegenüber dem Hauttest zeigen sich im Hinblick auf die bessere Sensitivität bei BCG-Geimpften (77 % vs. 59 %).

### **LAM-ELISA**

Eine Immunantwort wird auch beim Immunoassay nach Chan<sup>26</sup> gemessen, bei dem das Vorhandensein von Antikörpern im Serum gegen das Mycobakterium spezifische Lipopolysaccharid Lipoarabinomannan (LAM) sichtbar gemacht wird. Das Antigen LAM wird über den Urin Infizierter ausgeschieden<sup>44,92</sup>. Dies macht sich der LAM-ELISA (Chemogen, So. Portland, ME, USA) zunutze, der aus

unbehandeltem Urin das Antigen an spezifische Antikörper bindet<sup>21</sup>. Zuletzt konnte hiermit allerdings nur eine Sensitivität von 50,7% erreicht werden<sup>78</sup>.

### **Nucleic Acid Amplification Tests (NAAT)**

Molekulardiagnostische Tests, die den Nachweis spezifischer Nukleinsäuresequenzen einschließen, können prinzipiell für eine rasche Diagnose sowohl pulmonaler als auch extra-pulmonaler Tuberkulose genutzt werden<sup>51</sup>. Einige dieser sogenannten Nucleic Acid Amplification Tests (NAAT) für Tuberkulose sind bereits kommerziell erhältlich. Im Allgemeinen zeigen diese Tests eine hohe Sensitivität, die an die der Kultur heranreicht. Für die PCR (Polymerase chain reaction), die mykobakterielle DNA vervielfältigt, existieren eine Reihe individueller Laborprotokolle („inhouse PCR“). Es werden vor allem respiratorische Proben (Sputum oder Bronchiallavage) analysiert, bei denen Sensitivität und Spezifität sehr hoch liegen. Das Ziel der Amplifikation ist meist die Sequenz IS6110<sup>76</sup>. Noordhoek und Mitarbeiter<sup>70</sup> stellen allerdings große Qualitätsunterschiede bei den verwendeten Verfahren in unterschiedlichen Laboratorien fest.

Die DNA-amplifizierenden Methoden sind jedoch noch nicht im großen Maßstab in Entwicklungsländern etabliert aufgrund der damit verbundenen Kosten, der Komplexität der Tests und beispielsweise auch der aufwendigen Aufarbeitung von Sputum, die dazu nötig ist. In einem Versuch, diese Schritte der Sampleaufarbeitung zu umgehen und eine robustere diagnostische Methode zu entwickeln, haben einige Studien die Amplifikation und Detektierung von *M. tuberculosis* DNA im Urin von TB Patienten untersucht. Diese Herangehensweise ist attraktiv, da Urinproben leichter und sicherer zu sammeln sind als Sputum, das mit der Produktion infektiöser Aerosole einhergehen kann und speziell bei Kindern schwierig zu gewinnen ist. Während NAAT bei Urinproben sich bei der Detektierung von Tuberkulose der Harn- und Geschlechtsorgane als effektiv herausgestellt haben<sup>39</sup>, hat sich die Sensitivität dieser Herangehensweise bei der Detektion der häufigeren pulmonalen und extrapulmonalen Formen der Krankheit als variabel gezeigt<sup>17,57,82,94</sup>. Botezatu et al.<sup>22</sup> berichten über die Entdeckung zellfreier DNA-Fragmente (150 bis 200 Basenpaare) im Urin, die von Zellen stammen, die im ganzen Körper zugrunde gehen. Sie schätzen, dass lediglich ca. 0,5 bis 2 % der freien DNA, die durch den Blutkreislauf strömt, die

Nierenschranke überquert und mit dem Urin ausgeschieden wird, demonstrierten allerdings, dass dieses Phänomen zu diagnostischen Zwecken ausgenutzt werden kann. An Mäusen, die intraperitoneal mit gelabelter Phagen-DNA injiziert wurden, wurde gefunden, dass sie ungefähr 3% der DNA in einem 3-Tages-Zeitraum ausscheiden. Ein noch kleinerer Anteil der injizierten DNA (0,06%) war im sauren Milieu unlöslich und wurde in polymerer Form im Urin ausgeschieden, davon die vorherrschende Fraktion ungefähr 150 Basenpaare lang und damit von potentiell diagnostischen Nutzen. Der diagnostische Wert dieses Unterfangens wurde weiter gezeigt an Menschen mit dem Nachweis von männlichen Genen im Urin von Schwangeren mit einem männlichen Fötus oder Frauen, die kürzlich Blut von einem männlichen Spender transfundiert bekommen hatten. Auch bei Patienten mit Kolon- oder Pankreascarcinomen konnten K-ras Mutationen bei präoperativer Urinuntersuchung gefunden werden. Nachdem das bisherige Wissen davon ausging, dass diese DNA im Urin dadurch erscheint, dass sie die Nierenschranke überquert, wurde sie Transrenale DNA (Tr-DNA) genannt<sup>63</sup>.

Folgende neuere Erkenntnisse lassen auf eine Weiterentwicklung transrenal DNA-PCRs hoffen:

- Studien beweisen das Vorhandensein transrenal DNA im Urin<sup>22,63,88</sup>, also zirkulierender DNA, die über die Niere ausgeschieden wird;
- die Wahrscheinlichkeit, kleine zirkulierende DNA in der Größe von 150 bis 250 Nukleotiden im Urin zu finden, ist größer als bei langen Sequenzen<sup>89</sup>;
- der Zusatz von Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und die Lagerung bei -80°C erhöhen die Stabilität der DNA in Urinproben<sup>67</sup>;
- die modifizierte Guanidin/Promega Methode zur DNA Extraktion aus Urin ist besonders für kleine Sequenzen geeignet<sup>97</sup>;
- das Gen cfp32 ist eine konservierte Sequenz innerhalb der Mykobakterien des Mycobacterium tuberculosis complex und damit eine geeignete diagnostische Zielsequenz<sup>50</sup>.

Wichtig ist außerdem, dass das Konzept der transrenal DNA nicht von einer spezifischen molekularen Plattform, wie der PCR, abhängt. Sind einmal die prinzipiellen Nachweise erbracht, dass sich kleine DNA-Stücke von Mycobacterium tuberculosis im Urin von TB-Patienten befinden, kann dies auf jener molekularen Plattform umgesetzt werden, die am leichtesten und kostenkünstigsten einzusetzen ist und die besten Ergebnisse liefert.

## 2.5 Internationale Programme zur Bekämpfung der Tuberkulose

Unter der Überschrift „Millennium Development Goals“ haben sich im September 2000 auf dem United Nations Millennium Summit die Vertreter aller Länder verpflichtet, acht Ziele bis 2015 mit Nachdruck zu verfolgen. Eines der Ziele lautet, die Ausbreitung von Krankheiten, speziell von HIV/Aids und Malaria, aber auch anderer Krankheiten wie Tuberkulose einzudämmen.<sup>13</sup> Auf diesem Ziel gründet das Engagement der Weltgemeinschaft und speziell der Weltgesundheitsorganisation gegen die Verbreitung der Tuberkulose.

Die speziellen Ziele für die Tuberkulose sind damals wie folgt beschrieben worden:

bis 2005 70% der smear-positiven Patienten zu erkennen;

von diesen 85% erfolgreich zu behandeln;

bis 2015 die Inzidenz zu halten und den Trend umzukehren;

TB Prävalenz und Todesraten zwischen 1990 und 2015 zu halbieren<sup>14,45</sup>.

### 2.5.1 DOTS und DOTS-PLUS

Schon 1991 wird auf der World Health Assembly die Tuberkulose als ein weit verbreitetes Problem der öffentlichen Gesundheit thematisiert. Als eine Antwort darauf wird 1994 das DOTS Programm (für Directly Observed Treatment – short course) aufgelegt, eine Kontrollstrategie für Tuberkulose.

Die DOTS-Strategie beinhaltet fünf Elemente:

- Politische Entschiedenheit;
- unter Personen mit länger andauerndem Husten Fälle mit TB mittels Sputummikroskopie zu erkennen;
- standardisierte „short course“ Therapie unter ordentlichen Bedingungen der Betreuung des Patienten einschließlich Behandlung unter Beobachtung;
- regelmäßiges Vorhandensein von Medikamenten;
- ein standardisiertes System der Buchhaltung und Berichterstattung, das eine Überprüfung der individuellen Patienten wie des ganzen Programms erlaubt<sup>5</sup>.

Die DOTS-Strategie haben bis zum Jahr 2006 182 Länder eingeführt. Bis 2004 sind mehr als zwanzig Millionen Patienten unter DOTS behandelt worden. Auch 1991 sind schon die unter den „Millennium Development Goals“ genannten Ziele zur Erkennung und Behandlung genannt worden, damals bis zum Jahr 2000.

2004 betrug die Erkennungsrate 53%, der Behandlungserfolg der erkannten TB-Fälle näherte sich 2003 mit 83% dem Ziel von 85%.

Durch die Ausbreitung multiresistenter Tuberkulose, sogenannter MDR-TB (multidrug-resistant tuberculosis), ist für betroffene Gebiete eine Umwandlung des DOTS-Programms in ein DOTS-Plus Programm vorgesehen, das unter bestimmten Bedingungen den Einsatz von Reserve-Tuberkulostatika vorsieht. Besonderen Wert wird auf Resistenztestung, Drug Monitoring und die strikte Einhaltung der täglichen Therapie unter Beobachtung gelegt<sup>62</sup>. DOTS-Plus wird bereits in 35 Pilotprojekten an über 10000 Patienten eingesetzt<sup>7</sup>.

### **2.5.2 StopTB**

Das weitestreichende Ziel hat sich die StopTB Partnership gesetzt: eine Welt frei von Tuberkulose im Jahr 2050. Das Netzwerk mit Sitz in Genf besteht seit 1998 und verbindet heute über 400 Partner aus öffentlichen Organen, Nicht-Regierungs-Organisationen, akademischen und wirtschaftlichen Institutionen. Ihr Programm zur Kontrolle der Tuberkulose schließt die DOTS-Strategie der WHO mit ein, geht aber noch darüber hinaus. Im jüngsten Global Plan to Stop TB 2006-2015 baut man auf die Zusammenarbeit der sieben Arbeitsgruppen, die sich in den Bereichen der Ausweitung von DOTS und DOTS-Plus, der Verknüpfung von Forschung und Programmen von TB und HIV, neuer Diagnostik für TB, neuer Medikamente, neuer Impfungen und der sozialen Dimension von TB austauschen. Beispiele für Partner sind die Global Drug Facility und das Green Light Committee, die sich für die Bereitstellung von Medikamenten im Rahmen der DOTS und DOTS-Plus Programme einsetzen<sup>7,8,77</sup>.

### **2.5.3 Foundation for Innovative New Diagnostics (Find)**

Die gemeinnützige Organisation FIND ist ein Mitglied der Stop TB Partnership. Unter anderem unterstützt und koordiniert sie die Entwicklung neuer diagnostischer Möglichkeiten der Tuberkulose. Erfolgsversprechende diagnostische Methoden sollen an die Bedürfnisse armer Länder angepasst und in ihrer Effizienz und Wertigkeit miteinander verglichen werden. Der Erfolg der neuen diagnostischen Möglichkeiten soll dann am Einfluss auf die Inzidenz- und Prävalenzraten gemessen werden<sup>6</sup>. Auf drei verschiedenen Ebenen des Gesundheitssystems sollen neue Tests unterstützt werden. Dabei geht man davon aus, dass auf der Stufe des „Health post“ 60 %, in Mikroskopiezentren 30 % und in Referenzlabors zehn Prozent der Patienten erreicht werden können. Als Alternative zu bestehenden Tests sehen Perkins et al. vereinfachte Methoden

der Nukleinsäure-Amplifikation (NAAT), wie der PCR, auf den Ebenen des Mikroskopiezentrum und des Referenzlabors<sup>75</sup>.

### 3 Problemstellung und Zielsetzung

Ein Ende der Ausbreitung von Tuberkulose ist bedingt durch die HIV-Epidemie und die Entstehung resistenter Tuberkulose-Keime nicht in Sicht. Internationale Programme haben dort Erfolge in der Bekämpfung der Tuberkulose, wo sie wissenschaftlich begründet und nach den Methoden moderner Medizin durchgeführt werden. Am Anfang jedes individuellen Falles mit Verdacht auf eine Infektion mit dem Tuberkelbakterium steht die schnelle und sichere Diagnose.

Wie bereits in der Einleitung (2.4.4) dargestellt, gibt es sensitive und spezifische Methoden zum Nachweis von Tuberkulose mittels PCR. Allerdings funktionieren diese Nachweise nur in Sputum (bei pulmonaler TB) und Blut (bei disseminierter TB). Im Rahmen dieser Doktorarbeit soll die Beobachtung<sup>22</sup>, dass der Nachweis zugrundegegangener Zellen, sei es körpereigen oder fremd, durch die Amplifikation kurzer Fragmente von DNA im Urin möglich ist, am Beispiel der Tuberkulose untersucht werden.

Hierbei ergeben sich einige zu lösende Probleme:

- Wieviel DNA kommt bei TB im Urin an: Zu dieser Frage ist noch sehr wenig bekannt. Hinweise können hier zwar andere Erfahrungen mit transrenaler DNA, etwa bei Tumoren oder Schwangerschaft, geben, speziell für die Tuberkulose liegen hier jedoch noch keine Daten vor. Selbst die Menge an Tuberkelbakterien im Blutkreislauf zu unterschiedlichen Krankheitsstadien, sozusagen eine „bacterial load“, scheint wenig untersucht.
- Wie kann der Urin gewonnen werden: Hier geht es vor allem um die Stabilisierung einer gewonnenen Probe durch additive Agenzien, um den Zustand der Probe zum Zeitpunkt der Abnahme zu konservieren, wenn möglich über Monate bis Jahre, jedoch mindestens bis zum Zeitpunkt der Weiterverarbeitung.
- Wie muss das Probenmaterial Urin gelagert werden, um einen Abbau von DNA zu verhindern: Eine wichtige Rolle spielen hier die Lagerungstemperatur und die zuvor erwähnten Stabilisatoren.
- Wie wird die DNA am besten aus Urin aufgereingt: Wünschenswert wäre das Vorliegen von purer DNA in Wasser gelöst. Dabei geht es vor allem um die Entfernung von Stoffen, die die PCR inhibieren könnten.

- 
- Die Spezifität für Mykobakterien des Mycobacterium tuberculosis complex: Es sollen spezifisch nur die Tuberkulose auslösenden Mykobakterien nachgewiesen werden, da sich die Behandlung atypischer Mykobakterien wesentlich von der Behandlung der Tuberkulose unterscheidet.
  - Die besonderen Bedingungen und die Umsetzbarkeit in den Tropen: Dies wird in erster Linie durch die Art der eingesetzten Probe bestimmt. Urin ist nicht nur einfach zu gewinnen, sondern birgt auch kein so großes Infektionsrisiko wie die Blutabnahme oder die Gewinnung von Bronchialsekret oder Magensaft. Angesichts der hohen Zahl an HIV/TB-Coinfizierten ist das Risiko für das medizinische Personal nicht unerheblich. Kleine Urinproben stellen desweiteren auch eine Möglichkeit für breite Screeninguntersuchungen dar. Trotz des Einsatzes der modernen Methode der PCR soll darauf geachtet werden, dass die Umsetzung einfach, kostengünstig und in den Tropen umsetzbar bleibt.
  - Schnelle Ergebnisse: Das diagnostische Ergebnis soll im günstigsten Fall noch am selben Tag vorliegen. Damit soll ein deutlicher Vorteil gegenüber der mehrere Wochen dauernden Diagnostik per Kultur geschaffen werden.
  - Aussagen über die Quantität: Die Methode soll bestenfalls Angaben machen können, wie viele Mykobakterien sich in der eingesetzten Probe befunden haben. Daraus können bei etablierter Anwendung einmal Rückschlüsse auf das Stadium der Erkrankung und eventuell auch zum Behandlungserfolg gezogen werden.

Die so getestete Methode soll in einem zweiten Schritt evaluiert und mit anderen Nachweisverfahren verglichen werden. Zur Bewertung stehen Urinproben von Patienten mit Verdacht auf Tuberkulose aus Mbeya, Tansania, zur Verfügung, bei denen Diagnostik mittels Mikroskopie und Kultur durchgeführt worden ist.

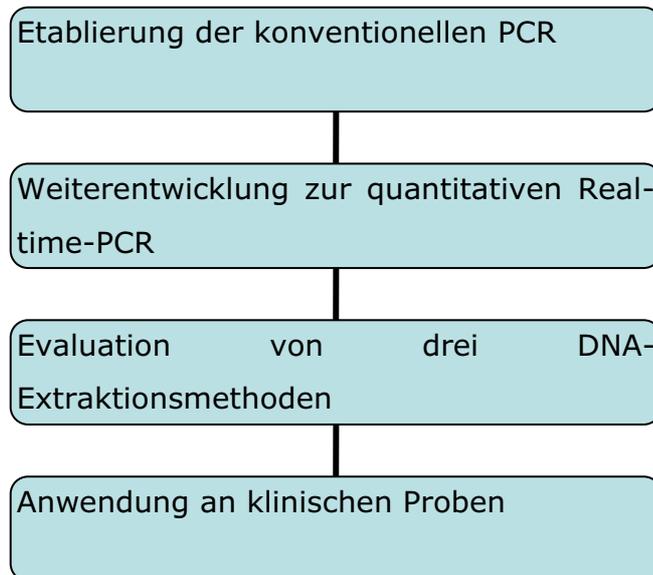
Die Hypothese dieser Arbeit lautet:

Es wird davon ausgegangen, dass kleine zell-freie Mycobacterium tuberculosis DNA-Fragmente, die von Infektionsherden außerhalb des Urogenitaltrakts stammen, im Urin von TB-Patienten nachzuweisen sind.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Überblick und Vorarbeiten

#### Überblick



Es soll eine PCR entstehen, die es möglich macht, Tuberkulose-DNA aus Urin von Tuberkulose-Infizierten nachzuweisen. Zunächst sollen die optimalen Reaktionsbedingungen ermittelt werden, unter denen die konventionelle PCR mit anschließender Gelelektrophorese die besten Ergebnisse liefert. Es findet dann eine Weiterentwicklung auf die Methode der quantitativen Real-time PCR statt, die die Möglichkeit der direkten Auswertung am Computer und der Bestimmung der Kopienanzahl bietet. Anschließend werden drei kommerziell erhältliche Methoden zur DNA-Gewinnung aus Urin mittels der neu entstandenen PCR bewertet. Die beste Methode wird letztlich an gesammelten Urinproben aus Tansania angewandt.

Die Arbeit findet durch Vermittlung von PD Dr. med. Michael Hölscher in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Alimuddin Zumla am Windeyer Institute of Medical Research des Centre for Infectious Diseases and International Health am University College of London, besonders Herrn Huggett, Ph.D., und des Mbeya Medical Research Programme in Mbeya, Tansania, statt.

## Vorarbeiten

Für die angestrebte PCR sind bereits die DNA-Sequenzen der Primer, die an Anfang und Ende der Zielsequenzen binden, von Herrn Huggett bestimmt worden. Zielsequenz ist ein Abschnitt des Gens *cfp 32*, das für den *Mycobacterium tuberculosis complex* spezifisch ist<sup>50</sup>.

Die Zielsequenz besitzt die folgende Sequenz:

```
AGAGAAGCGAATACAGGCAAGGCACGCCGAAGTGGGTCGACCTTCAGACCACCG
ATCAGTCCGCCGCCAAAAGTTCTACACATCGTTGTTCCGGCT
```

Mittels des BLAST-Programms (Basic Local Alignment Search Tool) des National Center for Biotechnology Information (Internetseite: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) konnte nachvollzogen werden (siehe Abbildung 10), dass die oben genannte Sequenz unter allen sequenzierten Genomen der Datenbank zu 100 % nur mit dem Genom von Tuberkulose-Mykobakterien übereinstimmt. Abbildung 11 zeigt die identische Übereinstimmung der *cfp32*-Zielsequenz und der Sequenzen der Genome von *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra NZ\_AAYK01000158 und *Mycobacterium tuberculosis* str. Haarlem cont1.3.

BLAST Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help

NCBI/BLAST/Microbes/Formatting Results - G6SNYTCZ01R

cfp32

Query ID |cd|17155 Database Name 988 databases  
 Description None Description [See details](#)  
 Molecule type nucleic acid Program BLASTN 2.2.18+ [Citation](#)  
 Query Length 96

Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#) [Distance tree of results](#)

Graphic Summary

Descriptions

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer

Sequences producing significant alignments:  
 (Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<a href="#">NZ_AAYK01000158.1</a>	<a href="#">Mycobacterium tuberculosis H37Ra NZ_AAYK01000158, whole genom</a>	178	178	100%	7e-43	100%	<a href="#">G</a>
<a href="#">NZ_AASN01000003.1</a>	<a href="#">Mycobacterium tuberculosis str. Haarlem cont1.3, whole genome shot</a>	178	178	100%	7e-43	100%	
<a href="#">NZ_AAKR01000011.1</a>	<a href="#">Mycobacterium tuberculosis C cont1.11, whole genome shotgun sequ</a>	178	178	100%	7e-43	100%	
<a href="#">NC_009565.1</a>	<a href="#">Mycobacterium tuberculosis F11, complete genome</a>	178	178	100%	7e-43	100%	
<a href="#">NC_009525.1</a>	<a href="#">Mycobacterium tuberculosis H37Ra, complete genome</a>	178	178	100%	7e-43	100%	
<a href="#">NC_008769.1</a>	<a href="#">Mycobacterium bovis BCG str. Pasteur 1173P2, complete genome</a>	178	178	100%	7e-43	100%	
<a href="#">NC_002945.3</a>	<a href="#">Mycobacterium bovis AF2122/97, complete genome</a>	178	178	100%	7e-43	100%	
<a href="#">NC_000962.2</a>	<a href="#">Mycobacterium tuberculosis H37Rv, complete genome</a>	178	178	100%	7e-43	100%	
<a href="#">NC_002755.2</a>	<a href="#">Mycobacterium tuberculosis CDC1551, complete genome</a>	178	178	100%	7e-43	100%	

Abbildung 10: Beschreibung der Genomsequenzen, die zu 100% mit der abgefragten Sequenz von *cfp32* übereinstimmen

```

>[ref|NZ_AAYK01000158.1|] [G] Mycobacterium tuberculosis H37Ra NZ_AAYK01000158, whole genome
shotgun sequence
gb|AAYK01000158.1| mycobacterium tuberculosis H37Ra, whole genome shotgun sequence
Length=8586

Score = 178 bits (96), Expect = 7e-43
Identities = 96/96 (100%), Gaps = 0/96 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      AGAGAAGCGAATACAGGCAAGGCACGCCGAACTGGGTTCGACCTTCAGACCACCGATCAGT  60
             |||
Sbjct 7727   AGAGAAGCGAATACAGGCAAGGCACGCCGAACTGGGTTCGACCTTCAGACCACCGATCAGT  7786

Query 61     CCGCCGCCAAAAAGTTCTACACATCGTTGTTTCGGCT  96
             |||
Sbjct 7787   CCGCCGCCAAAAAGTTCTACACATCGTTGTTTCGGCT  7822

>[ref|NZ_AASN01000003.1|] [D] Mycobacterium tuberculosis str. Haarlem cont1.3, whole genome
shotgun sequence
gb|AASN01000003.1| [D] Mycobacterium tuberculosis str. Haarlem cont1.3, whole genome
shotgun sequence
Length=47741

Score = 178 bits (96), Expect = 7e-43
Identities = 96/96 (100%), Gaps = 0/96 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      AGAGAAGCGAATACAGGCAAGGCACGCCGAACTGGGTTCGACCTTCAGACCACCGATCAGT  60
             |||
Sbjct 46928   AGAGAAGCGAATACAGGCAAGGCACGCCGAACTGGGTTCGACCTTCAGACCACCGATCAGT  46987

Query 61     CCGCCGCCAAAAAGTTCTACACATCGTTGTTTCGGCT  96
             |||
Sbjct 46988   CCGCCGCCAAAAAGTTCTACACATCGTTGTTTCGGCT  47023

```

**Abbildung 11: Zwei Beispiele für die übereinstimmende Nukleotidabfolge zwischen abgefragter Sequenz und sequenziertem Genom zweier Mycobacterium tuberculosis-Bakterien**

Um die PCR entwickeln zu können, muss das Gen in Plasmidform in großer Zahl vorhanden sein, um die prinzipielle Funktionsweise der PCR simulieren zu können. Dr. Huggett hat dazu das hergestellte Gen mittels Vektor in die DNA des Bakteriums *E.coli* eingesetzt und das Bakterium in Kultur angezchtet, um so das Gen zu vermehren (Klonierung). Ich habe zu Beginn meiner Arbeit die Sequenzen der Primer für die Genabschnitte „cfp32mini“ und „cfp32large“, sowie *E.coli*-Kulturen mit den jeweils enthaltenen Genabschnitten von Dr. Huggett zur Verfügung gestellt bekommen. Im April 2006 habe ich 78 Urinproben aus Mbeya, Tansania zur Weiterverarbeitung erhalten (siehe Kapitel 4.7).

## 4.2 Etablierung der konventionellen PCR

### Gewinnung der nachzuweisenden Genabschnitte aus *E.coli*-Bakterien (Teilschritte der Klonierung)

Die auf  $-20^{\circ}\text{C}$  in Glycerinlösung gelagerten *E.coli*-Kulturen wurden auf LB-Agar plattiert, der  $100\ \mu\text{g/ml}$  Ampicillin enthält. Die *E. coli*-Bakterien, deren Vermehrung erwünscht ist, enthalten den pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vektor (Promega) mit der gewünschten Zielsequenz (Insert) und ein Resistenzgen gegen das

Antibiotikum Ampicillin. Es wurden ca. 5 µl Glycerinlösung auf ca. 50 µl Agar gebracht und bei 37°C über Nacht im Schüttelinkubator kultiviert.

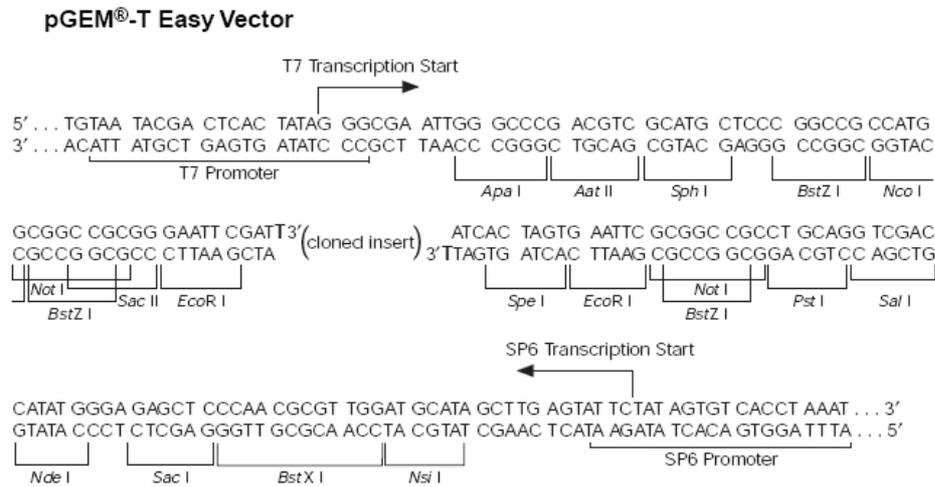
Am nächsten Tag wurde eine einzelne Kolonie mit einer Impföse vom Agar gepickt und diese wiederum mit ungefähr 5 ml LB-Agar (100 µl/ml Ampicillin) bei 37°C über Nacht im Schüttelinkubator bebrütet. Dieser Vorgang wurde noch mit zwei anderen Kolonien durchgeführt. In drei verschiedenen Gefäßen befand sich nun je eine Kolonie.

Aus je 1,5ml Agar mit der gewachsenen Bakterienkultur wurde mit dem Fast Plasmid® Mini Kit von Eppendorf nach Protokoll des Herstellers die DNA eluiert. Das Kit arbeitet mit einer enzymatisch-osmotischen Bakterienlyse. Die Plasmid-DNA wird in einem weiteren Schritt auf einer Membran eingefangen. Zunächst musste dazu die komplette Lyselösung (Lysissolution) hergestellt werden, indem der RNase/Lysozym Mix der Lyselösung zugegeben wurde. Die Lyselösung musste auf eine Temperatur von 0°C bis 4°C gebracht werden. Außerdem wurde dem Waschpufferkonzentrat 38 ml (bei dem Kit für 100 Preparationen) Isopropanol (95-100%) zugegeben. Die 1,5ml Bakterienkultur wurde in einem 2ml Kulturröhrchen (Culture Tube) in einer Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit (mindestens 13000 Umdrehungen pro Minute) pelletiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden 400 µl der kompletten Lyselösung zugegeben und das Pellett durch 30 Sekunden langes Mischen mit dem Vibrationsschüttler resuspendiert. Das Lysat wurde drei Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert und in eine Anordnung bestehend aus einer Säule und einem Abfallröhrchen (Waste tube) überführt. Es folgte die Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für eine Minute, die Zugabe von 400 µl Waschpuffer und eine erneute Zentrifugation mit den gleichen Bedingungen. Das Filtrat wurde aus dem Abfallröhrchen entfernt, so dass das Abfallröhrchen erneut bei einer weiteren einminütigen Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit genutzt werden konnte, um die Säule zu trocknen. Danach wurde die Säule in ein Sammelröhrchen gesetzt, 50 µl Elutionspuffer auf die Säule gegeben und so die DNA durch erneute einminütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit eluiert. Die eluierte Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert.

### **Restriktionsenzymverdau**

Der Restriktionsenzymverdau mit anschließender Auftrennung der DNA auf dem Agarosegel wurde durchgeführt um den Erfolg der Klonierung zu überprüfen. Um

die in den rekombinanten pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vektor eingesetzte Gensequenz freizusetzen, wurde das Restriktionsenzym EcoR1 benutzt. Der Vektor enthält exakt zwei Schnittstellen für dieses Restriktionsenzym, so dass nur das Insert herausgeschnitten wird (siehe Abbildung 12).



**Abbildung 12: Gensequenz des verwendeten Vektors mit der Stelle, an der der zu klonierende Genabschnitt eingesetzt wird (cloned insert) und den Schnittstellen für das Restriktionsenzym (EcoRI) aus <http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf>**

Der Enzymverdau wurde für zwei Stunden bei 37°C in einem Eppendorfgefäß mit dem unter Tabelle 6 aufgelisteten Ansatz durchgeführt und durch Hitzeinaktivierung gestoppt.

Tabelle 6: PCR-Ansatz für den Restriktionsenzymverdau

	Pro Kolonie
NEB-Puffer	2 µl
EcoR1	0,4 µl
Aqua	14,6 µl
Plasmid-DNA	3 µl

### Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode, mit der Moleküle getrennt werden können. Im Falle der DNA-Moleküle kann man sie auch zur Bestimmung der Länge und damit zur Überprüfung von gewonnenen Produkten benutzen. Die

DNA-Fragmente werden dazu in ein Agarosegel gegeben, das sich in einer Gelkammer mit Pufferlösung befindet. An die Gelkammer wird ein elektrisches Feld angelegt, in dem die negativ geladenen DNA-Moleküle (Anionen) zum positiv geladenen Pol (Anode) wandern. Behindert werden sie dabei durch die als Molekularsieb wirkende Agarosegelmatrix. Dadurch wird erreicht, dass die DNA je nach Länge eine unterschiedlich lange Strecke im Agarosegel zurücklegt. Durch den in das Gel zugegebenen interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid werden unter einer UV-Beleuchtung die aufgetrennten Fragmente als Banden sichtbar. Das Gel kann mit einer CCD-Kamera fotografiert und digital weiterverarbeitet werden.

Für die Produkte des Restriktionsenzymverdau wurde in unserer Versuchsanordnung Gel aus 100ml 1xTBE-Puffer und 1,2g Agarose (Seakem) hergestellt. Nach dem Kochen des Gemischs in der Mikrowelle wurden 2µl Ethidiumbromid zugegeben und das Gel auf dem Geltray um die Kämme für die Geltaschen herum gegossen. Nach dem Aushärten des Gels wurden je 12 µl des Produkts aus dem Enzymverdau mit 4 µl Blaupuffer versetzt und in die Geltaschen pipetiert. Außerdem wurde in eine Tasche 5 µl des Längenstandards 100 bp ladder, ein Gemisch von DNA-Fragmenten bekannter Länge, als Referenz gegeben, das parallel zur Probe mitlief. Das Gel auf dem Geltray wurde in die mit 1xTBE-Puffer gefüllte Gelkammer gelegt. Es wurde eine Spannung von 100mV angelegt. Nach ca. einer Stunde wurde das Gel unter dem UV-Licht betrachtet und fotografiert.

## **PCR**

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction=PCR) erlaubt die gezielte Vermehrung spezifischer DNA-Abschnitte aus einem Gemisch von DNA-Molekülen. Dabei flankieren die sogenannten Primer, eine Nukleotidsequenz auf dem „sense“-Strang der DNA und eine andere auf dem „antisense“-Strang, den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt. Die zugegebene DNA-Polymerase repliziert erst nach der Anlagerung der Primer und füllt die Stränge mit freien Nukleotiden auf (Elongation). Damit sich die Primer an die richtige Stelle der DNA anlagern, müssen sie aus der entsprechenden Komplementärsequenz hergestellt werden. Der Anlagerungsschritt (das Annealing) kann erst stattfinden, wenn es zur Trennung der beiden DNA-Stränge gekommen ist. Dieser als Denaturierung bezeichnete Schritt wird durch

Temperaturen um 95 °C erreicht. Üblicherweise werden 30 – 40 Zyklen von Denaturierung, Annealing und Elongation durchgeführt. Da diese Schritte bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt werden, benötigt man eine hitzestabile DNA-Polymerase, z.B die Taq-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*. Die Polymerase benötigt für ihre Reaktion Magnesiumionen und freie Nukleotide. Die PCR kann nur in einem bestimmten Puffermilieu ablaufen und findet in einem Thermocycler, einer Maschine zur exakten Temperaturregulierung, statt. Das Prinzip der Verfielfältigung von DNA-Abschnitten durch die PCR zeigt Abbildung 13.

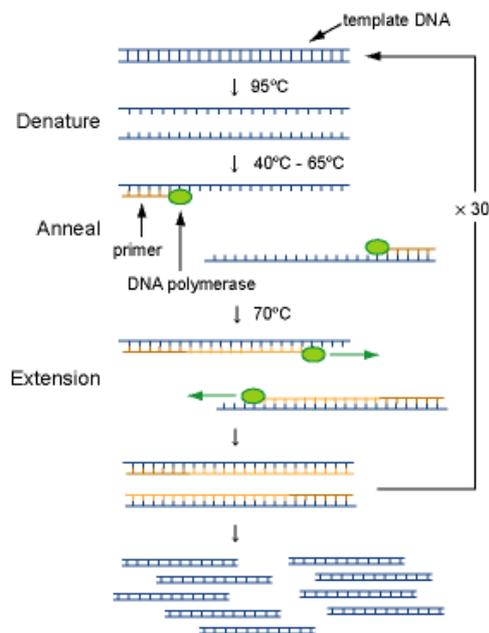


Abbildung 13: PCR-Zyklus aus URL: <http://www.246.ne.jp/~takeru/chalk-less/lifesci/images/pcr.gif>

Für eine Test-PCR wurde ein Produkt des Restriktionsenzymverdaus mehrmals im Verhältnis 1:10 mit Wasser verdünnt und in den Ansatz wie ihn Tabelle 7 zeigt eingesetzt.

Tabelle 7: Ansatz für Test-PCR

Komponenten	Je Probe (1x)
Wasser	12,6 µl
dNTPs	3,2 µl
10xPuffer	2,0 µl
Magnesiumchlorid	1,2 µl
Primer 1	0,4 µl
Primer 2	0,4 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Nach Zugabe von je 1 µl DNA aus dem Enzymverdau wurde der PCR-Ansatz im Thermocycler folgendem Temperaturprofil ausgesetzt: Nach einer fünfzehnminütigen Denaturierung bei 95°C folgten vierzig Zyklen mit 95°C für 30 Sekunden, 55°C für 60 Sekunden und 72°C für zwei Minuten. Abschließend wurde eine Elongationsphase von zehn Minuten bei 72°C eingestellt.

Es wurden die Primer JH\_MTB\_F3 und JH\_MTB\_R3 (siehe Tabelle 8) verwendet.

Tabelle 8: Name und Sequenz der verwendeten Primer

	Sequenzname	5' - 3' Sequenzen
Vorwärts-Primer	JH_MTB_F3	AAGAGAAGCGAATACAGGCAA
Rückwärts-Primer	JH_MTB_R3	CCGAACAACGATGTGTAGAACT

### Bestimmung der optimalen Annealingtemperatur

Da die Wahl der Annealingtemperatur wesentlichen Anteil am Erfolg des PCR-Produkts hat, wurde die PCR mit unterschiedlichen Temperaturen zur Primeranlagerung durchgeführt. Dafür wurde derselbe Ansatz wie oben verwendet. Als Thermocycler diente der TGradient von Biometra<sup>®</sup>, der es erlaubt, in jeder Reihe eine andere Annealingtemperatur einzustellen. Es wurden sieben Temperaturen zwischen 45 und 65°C (45°C, 45,5°C, 46,9°C, 51,4°C, 56,2°C, 60,9°C, 64,5°C) ausgewählt. Mit der anschließend durchgeführten Gelelektrophorese wurde die optimale Annealingtemperatur anhand der Bandenstärke bestimmt.

## 4.3 Weiterentwicklung zur quantitativen real-time PCR

### Umstellen der PCR auf SYBR Green und real-time

Die real-time PCR basiert auf dem gleichen Prinzip der exponentiellen DNA-Amplifikation wie die konventionelle PCR. Folgt dieser aber noch der Schritt der Gelelektrophorese zum Auswerten der Produkte, wird bei der real-time PCR die Entstehung des Produktes in Echtzeit gemessen und nach dem Laden der Daten im Anschluss auf dem Computerbildschirm angezeigt<sup>48</sup>. Die simultane Vervielfältigung und Auswertung erfolgt in Thermocyclern, die über eine UV-Lampe und eine CCD-Kamera verfügen. Zum Erzeugen eines Fluoreszenzsignals

wird hier der Farbstoff SYBR Green<sup>®</sup> I gewählt, der an doppelsträngige DNA bindet.

Die Thermocyclerbedingungen wurden von der optimierten konventionellen PCR verwendet (95°C für 15 Minuten, 40 Zyklen mit 95°C für 30 Sekunden, 56°C für eine Minute, 72°C für zwei Minuten und als abschließenden Schritt 72°C für zehn Minuten). Als Thermocycler diente das ABI Prism<sup>®</sup> 7700 Sequence Detection System. Es wurde nun folgender Master-Mix-Ansatz verwendet (Tabelle 9):

Tabelle 9: PCR-Ansatz für die real-time PCR mit SYBR<sup>®</sup> Green

	Je Probe (1x)
Power SYBR <sup>®</sup> Green	25 µl
Primer 1	1 µl
Primer 2	1 µl
Wasser	22 µl
DNA-Template	1 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Zur Kontrolle wurde das PCR-Produkt in die Gelelektrophorese eingesetzt und mit einem Produkt der konventionellen PCR verglichen. Das Gel wurde aus 250 ml TBE 1xPuffer, 6,25 g Methaphor Agarose und 5 µl Ethidiumbromid hergestellt.

### **Gelextraktion des cfp32-Genabschnitts**

Um später eine Standardkurve für die quantitative real-time PCR erstellen zu können, wurde der cfp 32-Genabschnitt, der das Target der Primer ist, in Reinform benötigt. Hierzu wurde zunächst ein PCR-Produkt aus einer konventionellen PCR in ein Gel eingesetzt. Zur Bestimmung der gewünschten cfp32-Bande lief ebenfalls der Längenmarker 100 bp ladder mit im Gel. Nach dem Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel unter dem UV-Licht betrachtet und die gewünschte cfp32-Bande mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Die Extraktion der DNA aus diesem Gelstück erfolgte mit dem QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit.

Das Gelstück wog ca. 100 mg. Es wurde in ein 1,5 ml Röhrchen gegeben. Da das DNA-Fragment unter 100 Basenpaaren Länge hat, mussten laut Protokoll des Herstellers 600 µl des Puffers QX1 zugegeben werden. Nach einer Resuspension von QIAEX II wurden 10 µl davon in das Röhrchen zugegeben. QIAEX II besteht

aus Silicapartikeln, an denen die DNA gebunden wird. Die Adsorption der DNA an die Partikel findet nur in der salzigen Umgebung der zugesetzten Puffers statt. Das Röhrchen wurde während der anschließenden Inkubation für zehn Minuten bei 50°C alle zwei Minuten mit dem Vibrationsschüttler gemischt. Es war zu beachten, dass die Farbe der Suspension gelb bleibt und so der richtige pH-Wert sichergestellt war. Hätte sich der pH-Wert geändert, hätte die Lösung mit Natriumacetat versetzt werden müssen. Nach einer Zentrifugation bei 14000 rpm für 30 Sekunden wurde der Überstand mit einer Pipette entfernt. Es folgten drei Waschschriffe mit den Puffern QX1 und PE, nach denen das Pellet 15 Minuten lang luftgetrocknet wurde. Der Eluierungsschritt mit Zugabe von 20 µl Wasser, Inkubation, Zentrifugation und Pipettierung des die DNA enthaltenden Überstandes in ein sauberes Röhrchen wurde zweimal durchgeführt, um die Ausbeute der eluierten DNA zu erhöhen.

### **Bestimmung der Konzentration des cfp32-Fragments**

Um eine genügend hohe Konzentration zu erreichen, die messbar ist, wurde die aus dem Gel extrahierte DNA einer weiteren PCR unterzogen, um die cfp32-Fragmente zu amplifizieren.

Anschließend musste aus dem PCR-Ansatz wieder die pure DNA gewonnen werden. Dazu wurde das E.Z.N.A.<sup>TM</sup> Cycle-Pure Kit eingesetzt (Protokoll: URL: <http://www.omegabiotek.com/productsrange/danrancleanup/dnarnacleanup%20PDF%20usermenu/0906menu/Cycle-Pure%20Kit%20082806.pdf>). 30 µl des PCR-Ansatzes wurden zusammen mit 120 µl eines CP Puffers in ein 1,5 ml Röhrchen gegeben und gevortext. Danach wurde die Probe auf eine HiBind<sup>®</sup> DNA Säule gebracht, die sich in einem sauberen 2 ml Sammelröhrchen befand. Die Anordnung wurde eine Minute lang bei 10000 g zentrifugiert. Auf die gleiche Weise folgten zwei Waschschriffe mit jeweils 500 µl Waschpuffer, der vorher aus dem Konzentrat und Ethanol hergestellt wurde. Im letzten Schritt wurde die DNA in einem weiteren Zentrifugationsschritt mit Wasser in ein sauberes 1,5 ml Röhrchen eluiert.

Die Konzentration (Masse pro Volumen in ng/µl) der eluierten DNA wurde mit dem NanaDrop ND-1000 Spektrophotometer gemessen. Dazu wurde 1 µl der DNA auf den Sockel des Geräts gebracht und der Apparat geschlossen. Mit dem Starten durch das Bedienen der Software komprimierte der Probenarm den

Tropfen und erzeugte somit eine Flüssigkeitssäule, in der die spektrale Messung vorgenommen wurde.

### **Erstellen einer Standardkurve**

Um für eine quantitative PCR definierte Standards erzeugen zu können, ist die Kopienanzahl in den Standards mit einer unabhängigen Methode zu bestimmen. Dies war durch die Messung im Spektrophotometer gegeben.

Die Berechnung des Molekulargewicht des cfp32 Genfragments erfolgte anhand folgender Überlegungen:

1 Base = 300 Dalton = 300 u

95 Basen = 28500 u

1 u =  $1,66054 \times 10^{-21}$  mg

95 Basen =  $4,732539 \times 10^{-11}$  ng

Die Länge des untersuchten cfp 32 Genfragments beträgt 95 Basen. Um die Kopienanzahl der cfp 32 Genfragmente zu ermitteln, musste die mit dem Spektrophotometer bestimmte Masse durch die Masse des 95 Basen langen Stückes dividiert werden. Die Kopienanzahl wurde hier auf die DNA-Einzelstränge des cfp32-Genabschnitts bezogen.

Nachdem die Kopienanzahl an cfp32 Genfragmenten pro  $\mu$ l in einem Röhrchen bestimmt wurde, konnten davon Verdünnungen im Verhältnis 1:10 hergestellt werden.

Als Test wurde ein PCR-Run mit fünf Verdünnungen mit bekannter Kopienzahl als Standards durchgeführt. Zwei zusätzliche Verdünnungen wurden als Unbekannte eingesetzt, um die von der PCR bestimmte Kopienzahl mit der tatsächlichen Kopienzahl vergleichen zu können.

## **4.4 Evaluierung von drei DNA-Extraktionsmethoden mit Hilfe gespikter Urine**

### **4.4.1 Herstellung gespikter Urine**

Fünf freiwillige Probanden, von denen keine gesundheitlichen Probleme bekannt waren, wurden gebeten, mindestens 50 ml Urin in Sammelbechern abzugeben. Es wurden von jeder Probe zwei Aliquots zu 25 ml in Falconröhrchen angelegt. In jedes Aliquotröhrchen wurden 0,5 ml 0,5 molarer EDTA;TrisHCl-Lösung pipettiert. Mit der Zugabe von EDTA und TrisHCl soll der Abbau von DNA verhindert werden<sup>67</sup>.

Jeweils ein 25 ml-Urinaliquot wurde mit  $2,3 \times 10^9$  Kopien des cfp32-Einzelstranges beimpft (Spiking). Die Beimpfung fand auch an zwei Wasserproben statt, die in der gleichen Weise wie die Urine behandelt wurden. Den folgenden DNA-Extraktionsmethoden wurden sowohl die Aliquots mit den beimpften Kopien als auch die ungespikten Proben unterzogen. Den Extraktions-Endprodukten der ungespikten Aliquots wurde anschließend die Anzahl an cfp32-Kopien zugegeben, die entsprechend der unterschiedlichen Vorgaben der jeweiligen Extraktionsmethode am Anfang der DNA-Extraktion in die gespikten Proben eingesetzt wurde. Somit konnte im Anschluss per PCR ermittelt werden, wie hoch der Anteil der durch die Extraktion gesammelten DNA war.

#### **4.4.2 Puregene Extraktion**

Der kommerziell erhältliche Puregene<sup>®</sup> DNA Purification Kit (im Weiteren bezeichnet als „Puregene“) basiert laut Hersteller auf einer modifizierten Methode der Salzpräzipitation. Hierbei handelt es sich um die Ausfällung von DNA und Proteinen unter bestimmten Salzkonzentrationen. Für den ersten Schritt der Zellyse wurden 100 µl Urin bzw. Wasser in ein 1,5ml Zentrifugenröhrchen gegeben, das zuvor mit 500 µl Zellyselösung versetzt wurde. Nach dem Mischen der Lösung mittels Pipette wurden 3 µl Proteinase K (20 mg/ml) zugegeben und das Lysat bei 55°C eine Stunde lang inkubiert.

Zu Beginn der Proteinpräzipitation wurde das Lysat fünf Minuten im Eisbad gekühlt und anschließend mit 200 µl Proteinpräzipitationslösung versetzt. Es folgte eine Vermischung durch Vortexen und eine weitere Kühlung im Eisbad für zehn Minuten. Durch Zentrifugation bei 13000 Umdrehungen pro Minute für drei Minuten wurden die ausgefällten Proteine an der Wand des Zentrifugenröhrchens pelletiert.

Zur DNA Präzipitation wurde nur der Überstand in ein sauberes 1,5 ml Röhrchen unter Zurücklassen der Proteinpellets mit der Pipette transferiert. In das saubere Röhrchen wurden zuvor 600 µl Isopropanal (100%) gegeben. Laut Protokoll musste das Röhrchen 50 mal gewendet werden und mindestens fünf Minuten auf Raumtemperatur gehalten werden. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (13000 Umdrehungen pro Minute für fünf Minuten) musste der Überstand verworfen und das Röhrchen auf sauberem saugfähigen Papier getrocknet werden. Das Waschen der DNA erfolgte mit 600 µl Ethanol (70%) mit anschließender Zentrifugation (13000 Umdrehungen pro Minute für eine Minute)

und Abgießen des Überstandes. Daran schloss sich die Lufttrocknung des Röhrchens auf sauberem saugfähigen Papier über 15 Minuten an.

Die nun extrahierte DNA wurde in 20 µl Hydratisierungslösung gelöst und zur kompletten Hydratisierung eine Stunde bei 65°C inkubiert. Dabei wurden die Röhrchen regelmäßig per Hand gedreht.

#### **4.4.3 Quiagen Extraktion**

Das Prinzip des QIAamp® DNA Mini Kit (im Weiteren bezeichnet als „Quiagen“) basiert auf der Bindung der DNA auf Silicagelmembranen. In mehreren Waschschritten werden Kontaminationen und Proteine entfernt.

Vor der eigentlichen Durchführung mussten noch Puffer und Protease vorbereitet werden. Dazu wurden 1,2 ml nukleasefreies Wasser zur lyophilisierten QIAGEN Protease gegeben und das Enzym im Wasser gelöst. Das Konzentrat des Puffers AW1 musste mit 25 ml Ethanol (96-100%), das des Puffers AW2 mit 30 ml Ethanol (96-100%) verdünnt werden.

Zuerst wurden 20 µl Protease in ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und 200 µl Urin bzw. Wasser zugegeben. Nach der Zugabe von 200 µl AL Puffer wurde das Gemisch 15 Sekunden lang mit dem Vibrationsschüttler gemischt. Der Inkubation bei 56°C für zehn Minuten schloss sich eine kurze Zentrifugation an, um Tropfen von der Innenseite des Röhrchendeckels zu entfernen. Jedes Sample wurde daraufhin mit 200 µl Ethanol versetzt, 15 Sekunden lang mit dem Vibrationsschüttler gemischt und kurz zentrifugiert. Das Gemisch wurde anschließend mit einer Pipette auf eine Drehsäule (QIAamp Spin Column), die sich in einem 2 ml Sammelröhrchen befand, gebracht und nach Schließen der Kappe bei 8000 Umdrehungen pro Minute eine Minute lang zentrifugiert. Das alte Sammelröhrchen mit dem Filtrat wurde verworfen und die Säule in ein neues Sammelröhrchen gebracht. Es folgten zwei Pufferschritte: Beim ersten wurden 500 µl AW1 Puffer auf die Säule appliziert, beim zweiten 500 µl AW2 Puffer. Der erste Pufferschritt wurde mit 8000 Umdrehungen pro Minute für eine Minute und der zweite mit 13000 Umdrehungen pro Minute für drei Minuten durchgeführt. Dem letzten Pufferschritt schloss sich die Lösung der DNA an, indem die Drehsäule in ein sauberes 1,5 ml Zentrifugenröhrchen überführt wurde und nach der Zugabe von 100 µl AE Puffer und der einminütigen Inkubation bei Raumtemperatur ein Zentrifugationsschritt mit 8000 Umdrehungen pro Minute für eine Minute erfolgte.

#### **4.4.4 Promega Extraktion**

Es wurde die modifizierte Guanidinisothiocyanat/Promega Wizard<sup>®</sup> Methode angewandt wie sie von Su et al.<sup>89</sup> beschrieben wurde (im Weiteren bezeichnet als „Promega“). Dazu wurden zunächst 3 ml Urin bzw. Wasser mit 4,5 ml Guanidinisothiocyanat versetzt.

Der Kit des Wizard<sup>®</sup> Plus Minipreps DNA Purification System bindet die DNA eines Samples an ein spezielles Harz und eluiert sie nach mehreren Waschschrritten in Wasser.

Begonnen wurde bei dieser Methode mit dem Anbringen des mitgelieferten Zylinders einer Spritze an das Luer-Lok<sup>®</sup>-Ansatzstück einer Minisäule. Außerdem musste von einer 3 ml Wegwerfspritze der Firma Becton-Dickinson der Kolben entfernt und bereitgehalten werden. 1 ml des Harzes wurde in den Lauf der Spritze gegeben. Dazu wurden die 7,5 ml des Urin/Guanidinisothiocyanat-Gemischs pipetiert und in Portionen durch die Minisäule gedrückt. Nach dieser Beladung der Säule wurden 2 ml Waschlösung durch die Säule gepresst. Zum Konzentrat der Waschlösung mussten zuvor noch 70 ml Ethanol (95%) gegeben werden. Der Schaft der Spritze wurde entfernt und die Minisäule in einem 1,5 ml Zentrifugenröhrchen bei 10000 Umdrehungen pro Minute für zwei Minuten zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues 1,5 ml Röhrchen gegeben. Zur Eluierung der DNA wurden 50 µl Nuklease-freien Wassers gegeben und eine Minute gewartet. Durch den letzten Zentrifugationsschritt (mit 10000 Umdrehungen pro Minute für 20 Sekunden) wurde die DNA in Wasser gelöst.

#### **4.5 Einsetzen extrahierter DNA in die q-rt-PCR**

Die extrahierte DNA aller drei Extraktionsmethoden wurde auf gleiche Weise der real-time PCR unterzogen um die Kopienzahlen der verschiedenen Proben bestimmen und vergleichen zu können.

#### **4.6 Vergleich der Extraktionsmethoden mit längerer Plasmid-DNA**

Es sollte auch untersucht werden, ob es Unterschiede in der Extraktion zwischen kurzen und langen DNA-Stücken aus dem Urin gibt. Prinzipiell besteht die Möglichkeit, dass menschlicher Urin unterschiedlich lange DNA-Stücke enthält. Dazu wurde das klonierte extrahierte Plasmid linearisiert, die Konzentration bestimmt, wie das kurze cfp32-DNA-Stück in bestimmter Menge in 5 Urine bzw. 2 Wasserproben gespikt, mit allen drei Methoden isoliert und mit der real-time PCR die Kopienzahl bestimmt. Zur Erstellung der Standardkurve wurden

Verdünnungen des linearisierten Plasmids verwendet. Die Kopienzahl wurde hier auf doppelsträngige DNA bezogen. Die Vorgehensweise bei der Standardkurve der Plasmid-DNA wurde auch bei den klinischen Proben beibehalten.

## **4.7 Anwendung von DNA-Extraktion und PCR an klinischen Urinproben aus Mbeya, Tansania**

### **4.7.1 Studienort**

In der Stadt Mbeya im südwestlichen Tansania existiert das Mbeya Medical Research Programme (MMRP), ein Gesundheitsentwicklungs- und Forschungsprojekt des Mbeya Referral Hospitals, des Mbeya Regional Medical Office, des National Institute of Medical Research, des U.S. Military HIV Research Programme und der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der LMU München (PD Dr. med. Michael Hölscher). Die Forschungsschwerpunkte des Programms liegen in der Epidemiologie von HIV, der Beschreibung des Risikoverhaltens unterschiedlicher Bevölkerungsgruppen bezüglich sexuell übertragbarer Krankheiten und der Diagnostik von Malaria und Tuberkulose<sup>12</sup>. Im Rahmen einer weiteren Studie zur Diagnostik der Tuberkulose wurden die Urinproben für diese Arbeit gewonnen.

In der Region Mbeya leben ungefähr 2 Millionen Menschen. Tuberkulose und HIV sind weit verbreitet. Im Jahr 2006 wurden 3601 TB-Fälle registriert<sup>68</sup>. Die HIV-Prävalenz beträgt laut einer großen Untersuchung etwa 13 %, mit Schwankungen zwischen 8 und 19 % an verschiedenen Orten<sup>56</sup>.

### **4.7.2 Probengewinnung, Transport, Lagerung**

Im März 2006 wurden im Mbeya Referral Hospital Urinproben von 78 sequentiellen Patienten gesammelt. Außerdem wurde von jedem Patienten Sputum gesammelt, das für das Ausstrichpräparat und die Löwenstein-Jensen Kultur verwendet wurde.

Einschlusskriterien für die Patienten waren:

Klinischer Verdacht auf pulmonale Tuberkulose: andauernder Husten länger als zwei Wochen;

die Patientin/der Patient ist in der Lage, mindestens 2 ml Sputum an zwei verschiedenen Zeitpunkten zu produzieren;

die Patientin/der Patient ist 18 Jahre alt oder älter.

Ausschlusskriterien für die Patienten waren:

die Patientin/der Patient befindet sich gerade in Behandlung gegen Tuberkulose;

die Patientin/der Patient kann keine 2 ml Sputum produzieren.

Die Patienten wurden gebeten, eine Probe Mittelstrahlurin in einem Urinbecher abzugeben.

Zur Aliquotierung einer Urinprobe wurden zwei 9 ml Urine DNA Stabilizer Monovetten<sup>®</sup> der Firma Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, ein steriler Multiadapter (Sarstedt) und Barcode Labels mit der Patienten ID benötigt. Die Monovetten<sup>®</sup> wurden speziell angefertigt und enthielten genau so viel EDTA und TrisHCL, dass bei Befüllung mit 9 ml Urin die Endkonzentration von EDTA und TrisHCL 10 mmolar betrug. Im Labor wurden die Angaben der Urinproben, die größer als 20 ml waren, mit der Patientenliste verglichen und mit einem Label versehen. Gelabelt wurden auch die zwei 9 ml Monovetten<sup>®</sup>, in die nacheinander unter Verwendung desselben Multiadapters Urin aufgezogen wurde.

Im direkten Anschluss an die Aliquotierung wurden die Proben in einem Gefrierschrank bei -70°C gelagert.

Nach Abschluss der Studie wurden die Proben in einer Styroporkiste, befüllt mit gefrorenem Kohlenstoffdioxid (-78,4°C, Trockeneis), gefroren von Mbeya nach München transportiert. Das Trockeneis wurde auf dem Transport einmal erneuert. In München wurden die Proben noch am Abend der Ankunft auf -20°C gefroren und am nächsten Tag auf -80°C gebracht.

#### **4.7.3 Verarbeitung der gewonnenen Urinproben**

Die gewonnenen Urinproben wurden nach der Promega Extraktionsmethode wie unter 4.4.4 beschrieben behandelt, um die enthaltene DNA zu isolieren. Dabei wurden von jeder Probe ca. 5 ml eingesetzt.

Für die real-time PCR wurde 1 µl DNA pro Ansatz verwendet.

## 4.8 Material

### 4.8.1 Chemikalien

Agarose	Biozym, Hessisch-Oldendorf
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Ethanol, absolut, reinst zur Analyse	AppliChem, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Isopropylalkohol, reinst zur Analyse	AppliChem, Darmstadt
LB-Agar	Invitrogen, Karlsruhe
LB-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
PBS pH=7,4	Gibco, Karlsruhe
10xTAE-Puffer (Tris, Na-Acetat, EDTA)	Roth, Karlsruhe
10xTBE-Puffer (Tris, Borsäure, EDTA)	Roth, Karlsruhe

### PCR:

MgCl <sub>2</sub> Solution 25 mM	Roche, Branchburg, USA
10xPCR Gold Buffer	Roche, Branchburg, USA
dNTPs	Qbiogene, Heidelberg
Power SYBR <sup>®</sup> Green Master Mix	Applied Biosystems, Woolston, UK
PCR-Primer	Thermo Electron, Ulm

### DNA-Marker:

100bp ladder	Invitrogen, Karlsruhe
--------------	-----------------------

### 4.8.2 Enzyme

Eco RI	New England Biolabs, Schwalbach
Not I	New England Biolabs, Schwalbach
AmpliTaq Gold <sup>®</sup> (Polymerase)	Roche, Branchburg, USA

### 4.8.3 Geräte

Autoklav Technorama	Integra Biosciences Tecnorama Deutschland GmbH, Fernwald
Brutschrank	Haereus Instruments, Hanau
Distriman <sup>®</sup> Pipette	Gilson, Bad Camberg

Mehrkanalpipetten Impact Laminar Flow	Matrix Technologies, Wilmslow, UK
Mikrowelle Privileg 8017E	Keßler+Luch GmbH, Giessen
Waage Kern 440-33	Quelle, Fürth
Wasserbad	Kern & Sohn, Balingen
Vortexer REAX top Schwabach (Vibrationsschüttler)	Haake, Berlin
	Heidolph Instruments GmbH,

Gelelektrophorese:

DNA Sub Cell	Bio-Rad, München
Horizon 11.14 USA	Life Technologies Inc., Gaithersburg,
GDS 8000 <sup>®</sup> , UV-Transilluminator, Gelanalyse- und Dokumentations- System Grabit <sup>®</sup>	UVP Products Ltd., Cambridge, UK

PCR:

TGradient	Biometra, Göttingen
Uno II	Biometra, Göttingen
ABI Prism <sup>®</sup> 7700 Sequence Detection Sytem	Applied Biosystems, Darmstadt

Zentrifugen:

Tischzentrifuge Mikro 22R	Hettich, Tuttlingen
Rotina 46	Hettich, Tuttlingen

**4.8.4 Kommerzielle Kits**

FastPlasmid <sup>®</sup>	Eppendorf AG, Hamburg
QIAEX <sup>®</sup> II Gel Extraction Kit	Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland
E.Z.N.A. <sup>™</sup> Cycle-Pure Kit Erlangen	PEQLAB Biotechnologie GMBH,
Puregene <sup>®</sup> DNA Purification Kit (from 100 µl Body Fluid)	Gentra Systems, Minneapolis, USA
QIAamp <sup>®</sup> DNA Mini Kit	Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Wizard <sup>®</sup> Plus Minipreps	Promega, Madison, USA

**4.8.5 Sonstiges**

Agarplatten (d= 90 mm), steril	Roth, Karlsruhe
Glasflaschen 250 ml, 500 ml	Schott AG, Mainz
Kulturröhrchen, steril	Roth, Karlsruhe
Zentrifugenröhrchen, 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Plastibrand® 1,5 ml Reaktionsgefäße	Brand GmbH, Wertheim
Safe-Lock® Tubes 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
9 ml Monovette®	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Multi-Adapter	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Quali-Filterpipettenspitzen, steril	Kisker, Steinfurth
Distritips® Mini syringes	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
96-V-Mikrotitrierplatte Oldendorf	Biozym Scientific GmbH, Hess.-
Optical Caps	Applied Biosystems, Foster City, USA
Ampuwa (Aqua, steril)	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Drigalski Spatel	Roth, Karlsruhe
Gasbrenner GASI	Schütt Labortechnik, Göttingen

(®=registered trademark

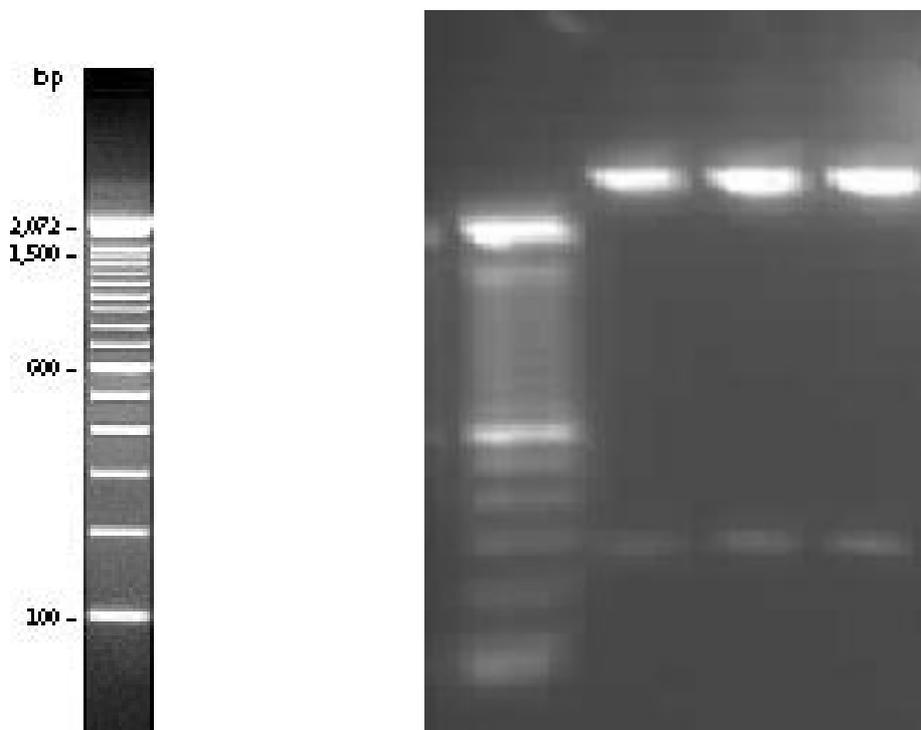
™= trademark

Es wird keine Gewähr für die Angaben übernommen.)

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Klonierung

Die erfolgreiche Vermehrung des das cfp32-Gen enthaltenden Inserts in den E.coli-Bakterien wurde nach dem Enzymverdau durch das Restriktionsenzym EcoR1 und der Extraktion der DNA durch die Auftrennung im Agarosegel nachgewiesen. In der ersten Tasche wurde der Längenstandard, die 100 bp DNA ladder von Invitrogen, in den nächsten drei Taschen die DNA aufgetragen.



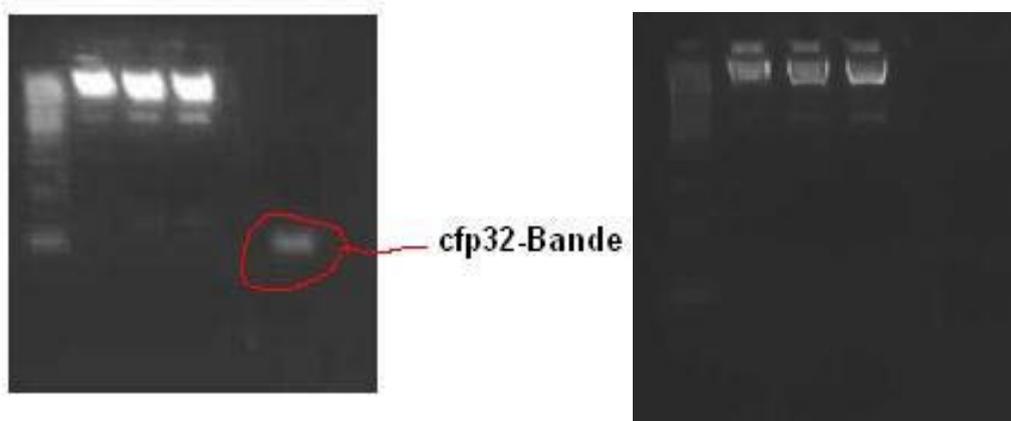
**Abbildung 14:** DNA-Leiter 100 bp ladder zum Vergleich der DNA-Größe (in 100 Basenpaar-Schritten); auch in den folgenden Abbildungen verwendet, wenn nicht anders angegeben.

**Abbildung 15:** Die schwächere Bande repräsentiert das Insert mit dem enthaltenen cfp32-Abschnitt, die stark leuchtende Bande (oberhalb 2072 bp) wird von der DNA des Vektors gebildet.

Die Banden oberhalb der Bande von 2072 bp (base pairs; Basenpaaren) entsprechen der DNA des vermehrten Vektors (3015 bp). Die Banden kurz unterhalb der 300 bp- Marke entsprechen der DNA des durch das Enzym EcoR1 herausgeschnittenen Inserts plus der Überhänge, bedingt durch die Schnittstellen des Restriktionsenzym.

## 5.2 Bestimmung der Konzentration des cfp32-Genabschnitts

Ein im Rahmen der Optimierungsversuche (siehe 5.3) gewonnenes Amplifikat einer Verdünnung einer in 5.1 in eine der DNA-Taschen gegebenen Mischung aus Vektor und cfp-Genabschnitt wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt. Amplifiziert wurde ein 95 Basenpaare langer Abschnitt des Gens cfp32. Unter dem UV-Licht wurde unter Kamerakontrolle die Bande dieses 95 Basenpaar langen Abschnitts herausgeschnitten und anschließend die darin befindliche DNA nach dem QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol extrahiert.



**Abbildung 16: Das Agarosegel vor dem Ausschneiden der cfp32-Bande**

**Abbildung 17: Das Agarosegel nach dem Ausschneiden der cfp32-Bande**

Die Abbildungen 16 und 17 zeigen das Gel vor und nach dem Ausschneiden der cfp32-95bp-Bande.

Nach der Extraktion enthielt das Eluat nun nur DNA dieses cfp32-Genabschnitts. Um die Kopienzahl zu erhöhen wurde 1  $\mu$ l einer 1:10-Verdünnung dieses Eluats einer PCR mit 40 Zyklen unterworfen. Durch die spezifischen Primer wurde nur der 95bp-Abschnitt von cfp32 amplifiziert.

30  $\mu$ l dieses PCR-Produkts wurden erst mit dem peQLab E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit von Bestandteilen des PCR-Mastermixes gereinigt und die Konzentration der verbleibenden DNA mit dem NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer bestimmt.

Die Konzentration der cfp32-DNA betrug 10,86 ng/ $\mu$ l.

Daraus wurde die Anzahl der Kopien der DNA-Einzelstränge des cfp32-Genabschnitts wie folgt berechnet:

$$1 \text{ Base} = 300 \text{ Dalton} = 300 \text{ u}$$

95 Basen = 28500 u

1 u =  $1,66054 \times 10^{-21}$  mg

95 Basen =  $4,732539 \times 10^{-11}$  ng

10,86ng sind wieviele Einzelstrang-Kopien n mit je einem Gewicht von  $4,732539 \times 10^{-11}$  ng?

$n = 10,86\text{ng} : 4,732539 \times 10^{-11} \text{ ng} = 2,2947512 \times 10^{11}$  Kopien/  $\mu\text{l}$

Mit der so gewonnenen Kopienzahl konnte über Verdünnungen eine Standardkurve für die real-time PCR erstellt werden (siehe Abbildung 18). Über diese Standardkurve mit den bekannten Kopienzahlen kann das Programm der real-time PCR die Kopienzahl von Proben unbekannter DNA-Konzentration bestimmen und somit eine quantitative Aussage über das Vorhandensein der Gensequenz machen, was im Fall der hier angestrebten PCR dem „Bacterial load“ von Tuberkelbakterien entsprechen soll.

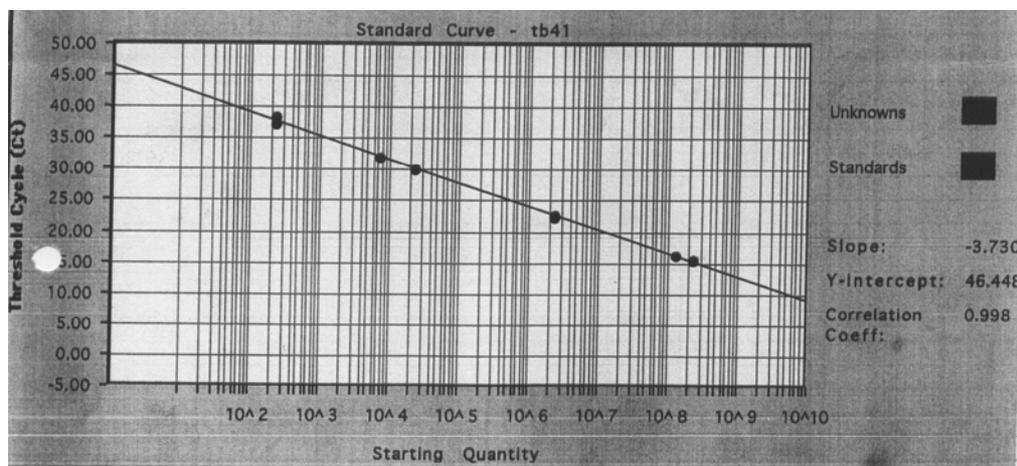
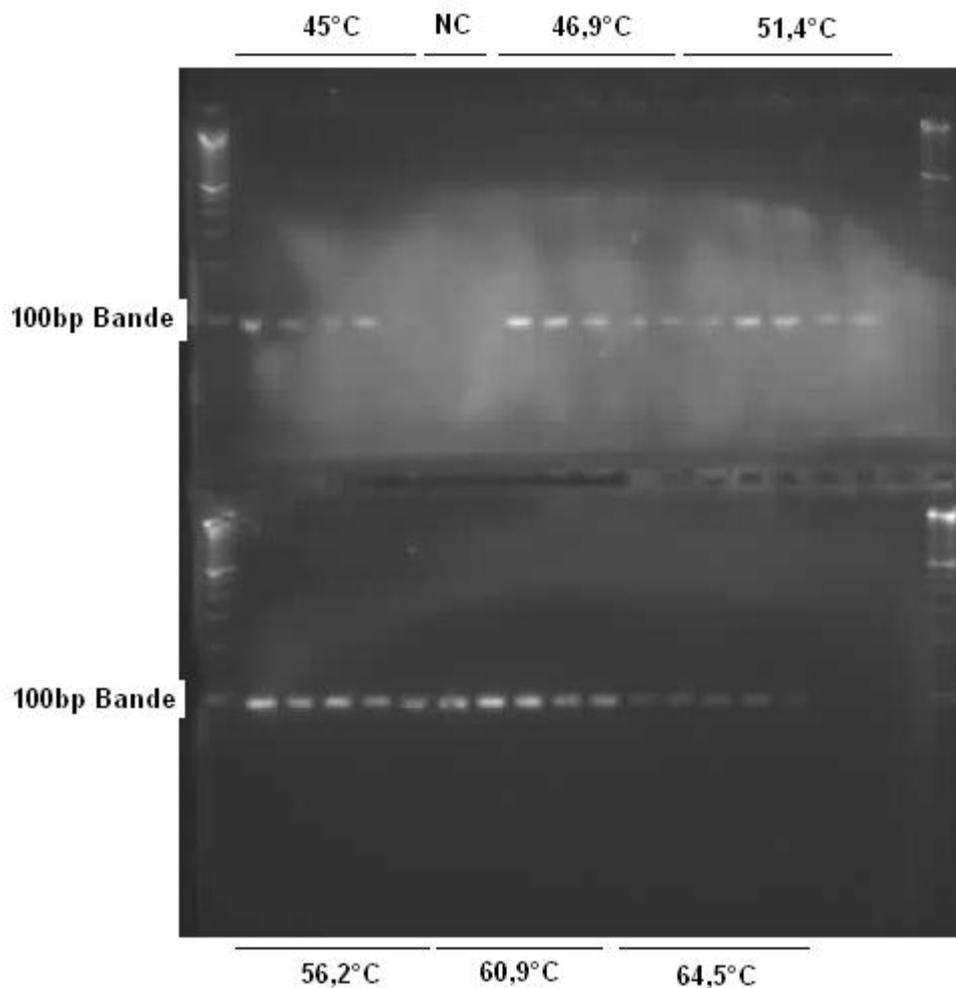


Abbildung 18: Das Bild zeigt eine nahezu lineare Kurve mit einem Korrelationskoeffizienten von 99,8 %, was auf eine exakte Aussage bezüglich der Quantität schließen lässt.

### 5.3 Optimierung der PCR

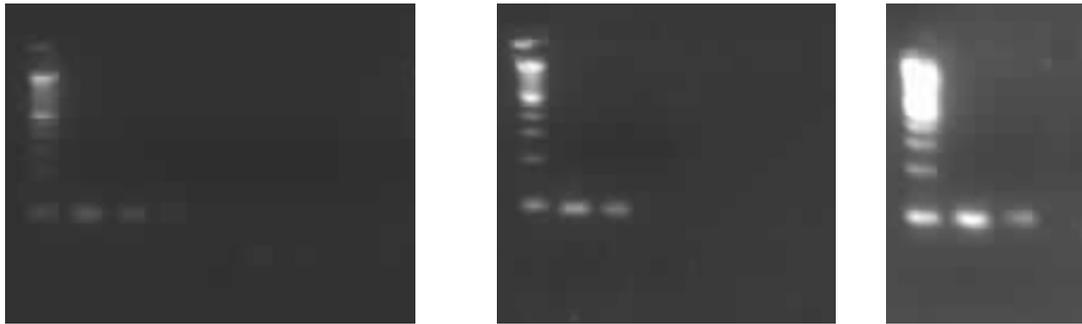
Es wurden auf der PCR-Maschine T-Gradient die unterschiedlichen Annealingtemperaturen von 45 °C, 46,9 °C, 51,4 °C, 56,2 °C, 60,9 °C und 64, 5 °C eingestellt.

Bei 56,2 °C zeigte sich im Agarosegel (siehe Abbildung 19) die eindeutigste Bande, so dass eine Annealingtemperatur von 56°C als optimal angesehen wurde.



**Abbildung 19:** Unterschiedliche Verdünnungen von cfp 32 (95 Basenpaare) bei den angegebenen Annealingtemperaturen; am Rand 100bp ladder. Die deutlichsten Banden sind bei 56,2°C zu beobachten.

Zunächst wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe der DNA aus 4.1 erstellt und die Verdünnung bestimmt, die nach einem PCR-Durchlauf noch auf dem Agarosegel als Bande ablesbar war. Dies war die achtfache 1:10 Verdünnung von DNA zu Wasser. Die PCR wurde dann auf das real-time PCR Gerät übertragen und mit den gleichen Thermocycler-Bedingungen wurde getestet, ob nach einem Durchlauf das neue Gerät die geringste Verdünnung in gleicher Weise amplifizierte wie die konventionelle PCR. Dazu wurden die PCR-Produkte beider Geräte auf dem Agarosegel verglichen (Abbildungen 20 und 21) und es konnte qualitativ eine gleich gute Amplifikation festgestellt werden.



**Abbildung 20: Amplifikat der konventionellen PCR (cfp 32 Abschnitt bei 95 Basenpaaren)**

**Abbildung 21: Amplifikat, erzielt auf der rt-PCR-Maschine**

**Abbildung 22: Amplifikat, erzielt auf der rt-PCR-Maschine unter Verwendung des Power SYBR® Green Master Mix**

Auch nach Einführung des Power SYBR® Green Master Mix konnte auf der real-time PCR diese Verdünnung gleich gut amplifiziert werden, wie das Agarosegel in Abbildung 22 zeigt.

Mit dem Erstellen der Standardkurve und der Anpassung der konventionellen PCR an das real-time PCR-Gerät und den real-time PCR Master Mix Power SYBR® Green, waren die Voraussetzungen gegeben um die Extraktion von DNA aus gespikten Urinproben zu bewerten und danach die beste Extraktionsmethode an klinischen Samples anzuwenden.

#### **5.4 Evaluation unterschiedlicher Extraktionsmethoden bezüglich Inhibierung und Potenz**

Berechnung der Kopienzahl an cfp32-Einzelstrang-DNA, die in 25 ml Urin bzw. Wasser eingesetzt wurden:

10 µl von einer Verdünnungslösung mit einer Konzentration von  $2,3 \times 10^8$  wurden in 25 ml Urin bzw. Wasser gegeben: damit enthielten 25 ml Urin bzw. Wasser  $2,3 \times 10^9$  Kopien.

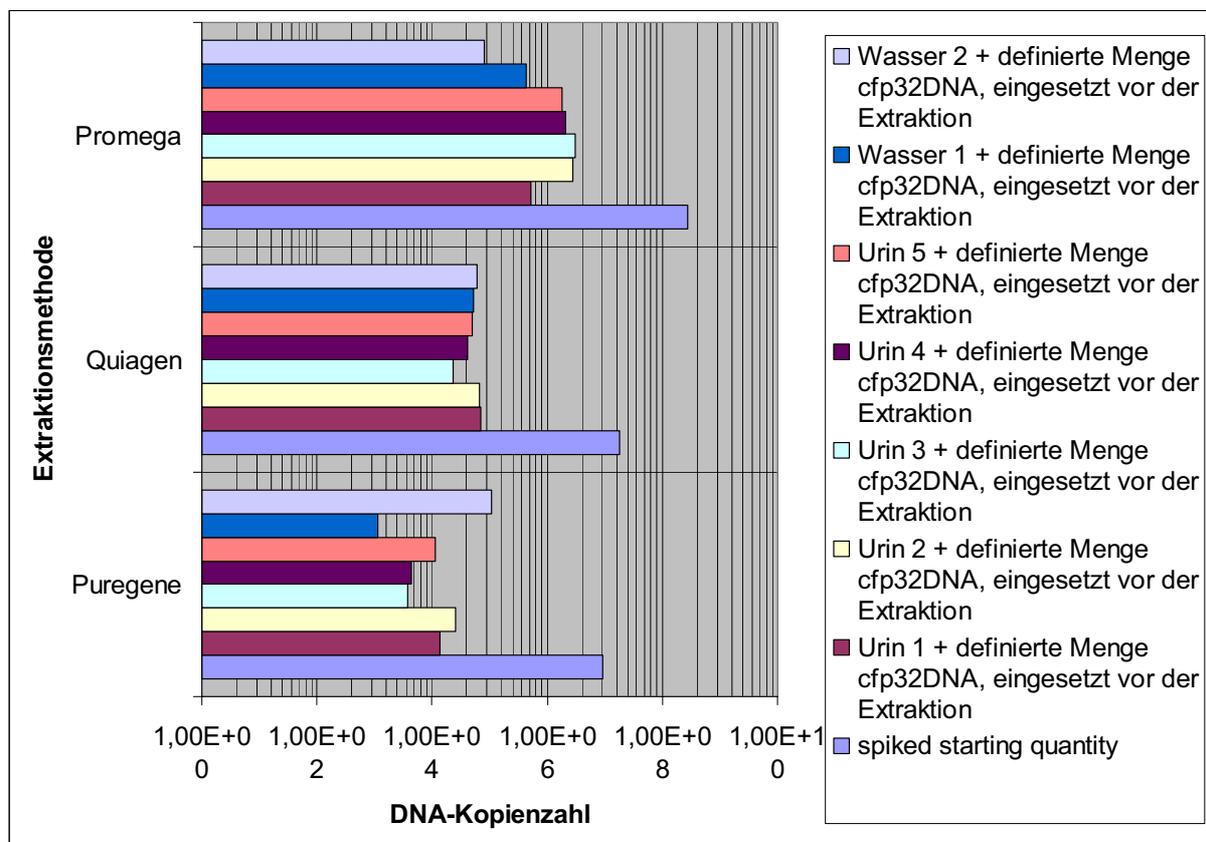
Tabelle 10 zeigt die Berechnung der Kopienzahl, die jeweils in der entsprechenden Extraktionsmethode eingesetzt wurde:

Tabelle 10: Berechnung der Kopienzahl bezogen auf die Extraktionsmethode; \*E+n=x10<sup>n</sup>

Extraktionsmethode	Einsatzvolumen	Berechnung Kopienzahl*	Kopienzahl*
Puregene	100 µl	0,1ml x (2,3E+9/25 ml)	9,2E+6
Quiagen	200 µl	0,2ml x (2,3E+9/25 ml)	1,84E+7
Promega	3 ml	3ml x (2,3E+9/25 ml)	2,76E+8

Die PCR-Daten wurden mit dem Microsoft Excel Programm und dem Programm Graph Pad Prism 4 ausgewertet. Abbildung A1 im Anhang zeigt beispielhaft die Ergebnisse der Promega-Extraktion, wie sie auf dem real-time PCR System präsentiert werden. Tabelle A1 (Anhang) liefert die detaillierten Beschreibungen dazu.

Abbildung 24 veranschaulicht grafisch die Anzahl der DNA-Kopien, die jeweils durch die drei Extraktionsmethoden in den Urinproben und Wasserproben gewonnen wurde.



**Abbildung 24: Extrahierte Anzahl an cfp32-Kopien in fünf unterschiedlichen Urinproben von Gesunden und zwei Wasserproben im Vergleich zur tatsächlich eingesetzten Menge (spiked starting quantity)**

In Abbildung 25 wird der Unterschied deutlich zwischen der tatsächlich eingesetzten und der extrahierten DNA-Menge.

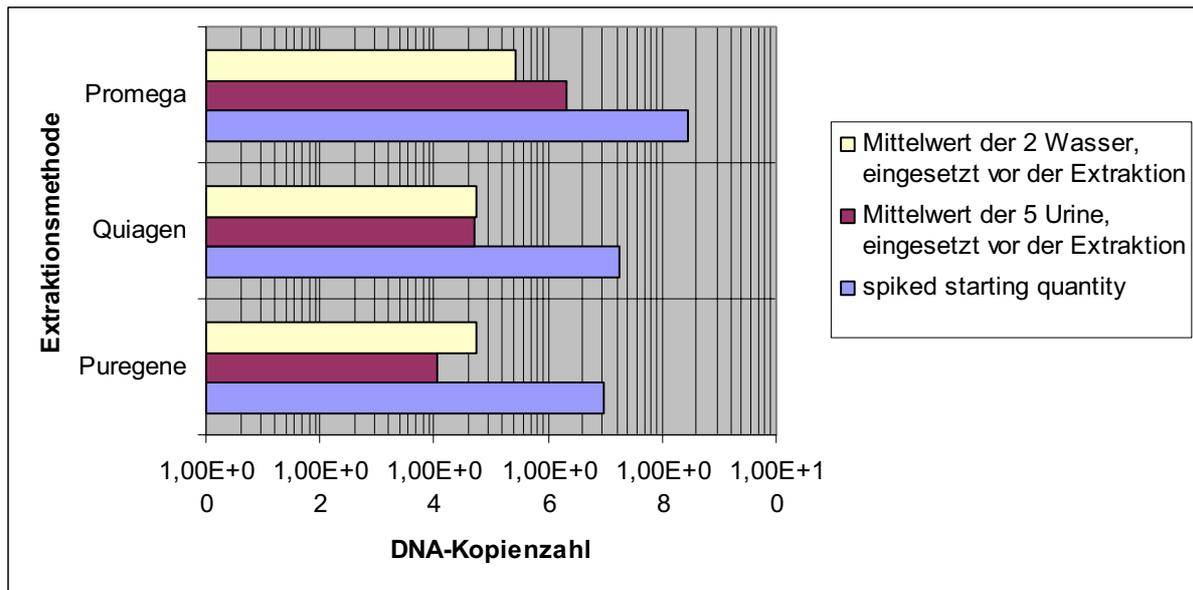


Abbildung 25: DNA-Kopienzahlen der durch die drei genannten Methoden extrahierte DNA in Wasser und Urin im Vergleich zur tatsächlich eingesetzten Menge (spiked starting quantity); Mittelwerte gebildet aus den Einzelwerten von Abbildung 24

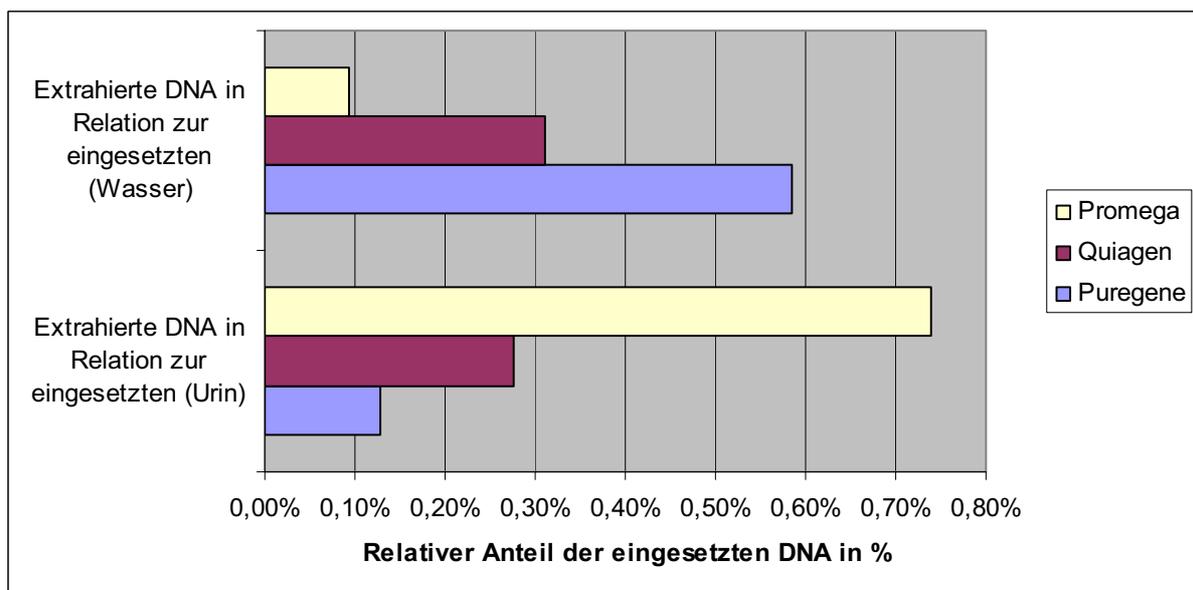
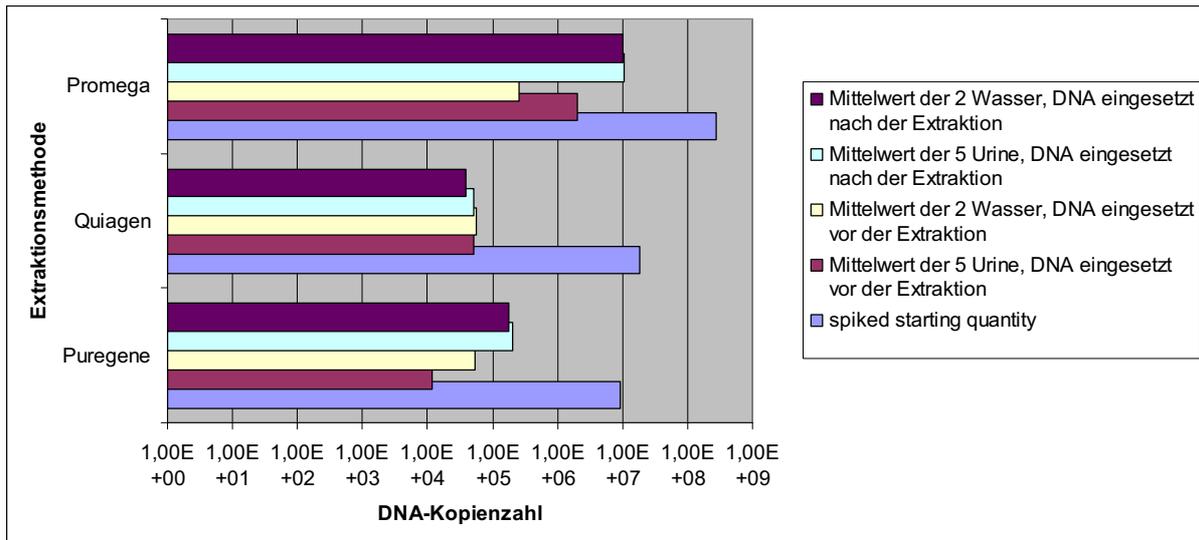


Abbildung 26: Relativer Anteil aus Wasser bzw. Urin extrahierter DNA im Verhältnis zur eingesetzten DNA-Menge bei den Extraktionsmethoden Promega, Quiagen und Puregene

Die Promega-Methode zeigt eine deutlich bessere Ausbeute bezogen auf das Samplmaterial Urin. Sie extrahierte prozentual den größten Anteil der eingesetzten DNA (siehe Abbildung 26).



**Abbildung 27: Vergleich der Kopienzahlen von vor und nach der jeweiligen Extraktionsmethode eingesetzten DNA bei Wasser und Urin. Spiked starting quantity: tatsächlich eingesetzte DNA-Menge**

Abbildung 27 verdeutlicht den Verlust an Dann; durch die Extraktionsmethode, durch das Samplmaterial (Urin bzw. Wasser) und die eingeschränkte Detektion der real-time PCR. In absoluten Zahlen konnte die Promega-Methode überzeugen, obwohl fraglich bleibt, warum die Extraktion aus dem Samplmaterial Wasser eine niedrigere Kopienzahl erbrachte als die aus Urin.

## Varianz der DNA-Recovery aus unterschiedlichen Urinen im Vergleich zum Mittelwert der DNA-Recovery aus Wasser

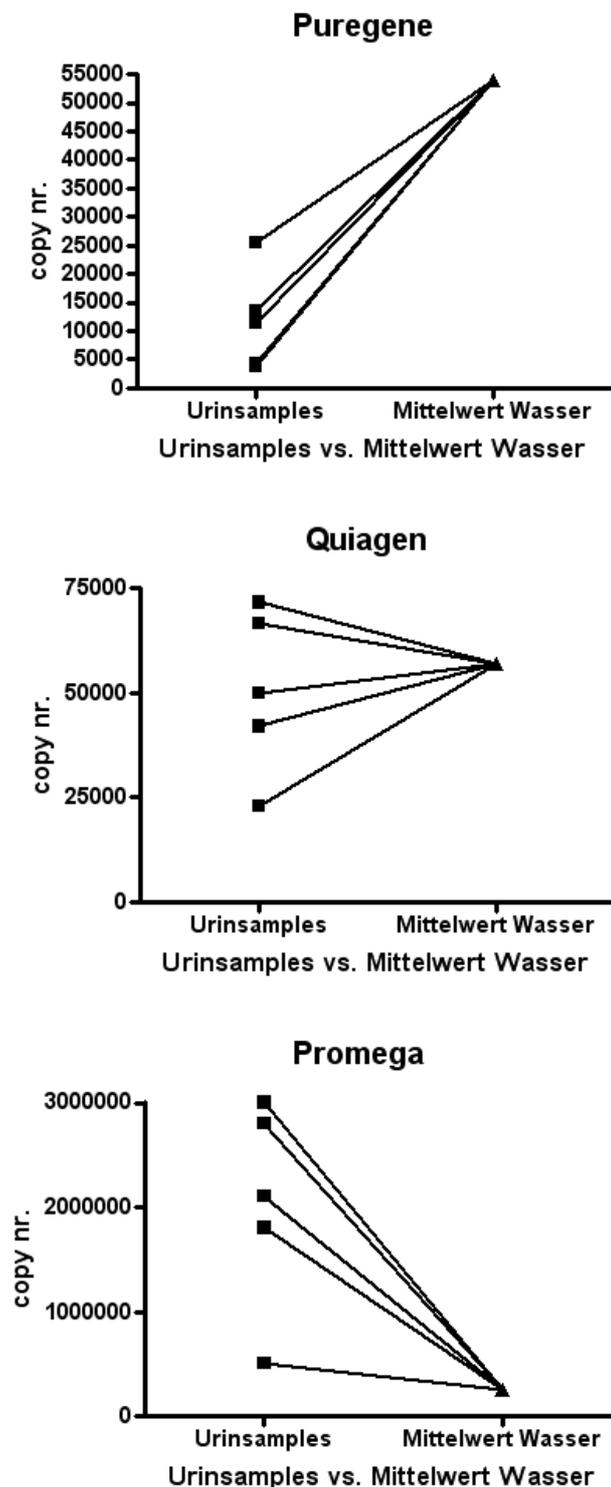


Abbildung 28: Verteilung der Kopienzahl der gespikten Urine im Vergleich zu gespiktem Wasser (Mittelwert der zwei Werte) bei der Puregene-, Quiagen- und Promega-Methode

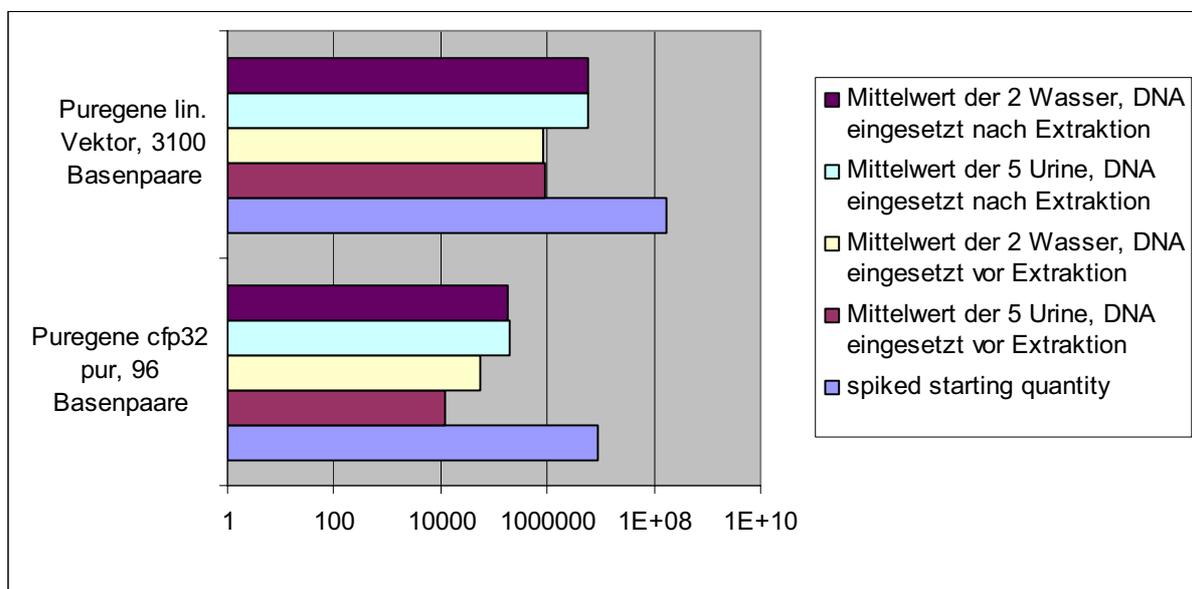
Alle drei Methoden zeigten (siehe Abbildung 28) eine Varianz bezüglich der 5 individuellen Urinsamples, allerdings ist eine genaue Analyse der Abweichungen in jeder Methode nötig:

Alle fünf Kopienzahlen aus Urinen, die mit dem Puregene-Kit extrahiert wurden, liegen unter den Werten, die aus Wasser extrahiert wurden und in etwa in einem Intervall von 5000 bis 25000 Kopien.

Quiagen extrahierte ungefähr zwischen 25000 und 75000 DNA-Abschnitte aus den Urinen. Die Werte liegen um den Wert des Mittelwerts der Wasserproben.

Die DNA-Recovery der Promega-Methode aus den Urinen liegt oberhalb der von Wasser in einem fünf- bis sechsstelligen Bereich. Damit konnte gezeigt werden, dass das Kit von Promega für das klinische Material Urin die beste Wahl darstellt.

Die an dem 95 Basenpaar kleinem DNA-Stück (Cfp32) gewonnenen Ergebnisse wurden verglichen mit Ergebnissen von den gleichen Versuchen mit einem etwa 3100 bp langen DNA-Strang, dem linearisierten pGem-Vektor, der auch den kleinen cfp32-Genabschnitt enthielt.



**Abbildung 29: Vergleich der DNA-Extraktion mit der Methode von Puregene. Oben ist die Extraktion des langen linearisierten Vektors dargestellt, unten die Extraktion des kurzen Genabschnitts. „Spiked starting quantity“ stellt die wirklich eingesetzte Menge an DNA-Kopien dar. Ein Vergleich zwischen DNA-Kopien in Urin und Wasser ist möglich. Außerdem ist der Verlust von DNA durch die Extraktion abzuschätzen (Unterschied zwischen DNA eingesetzt vor der Extraktion und nach der Extraktion)**

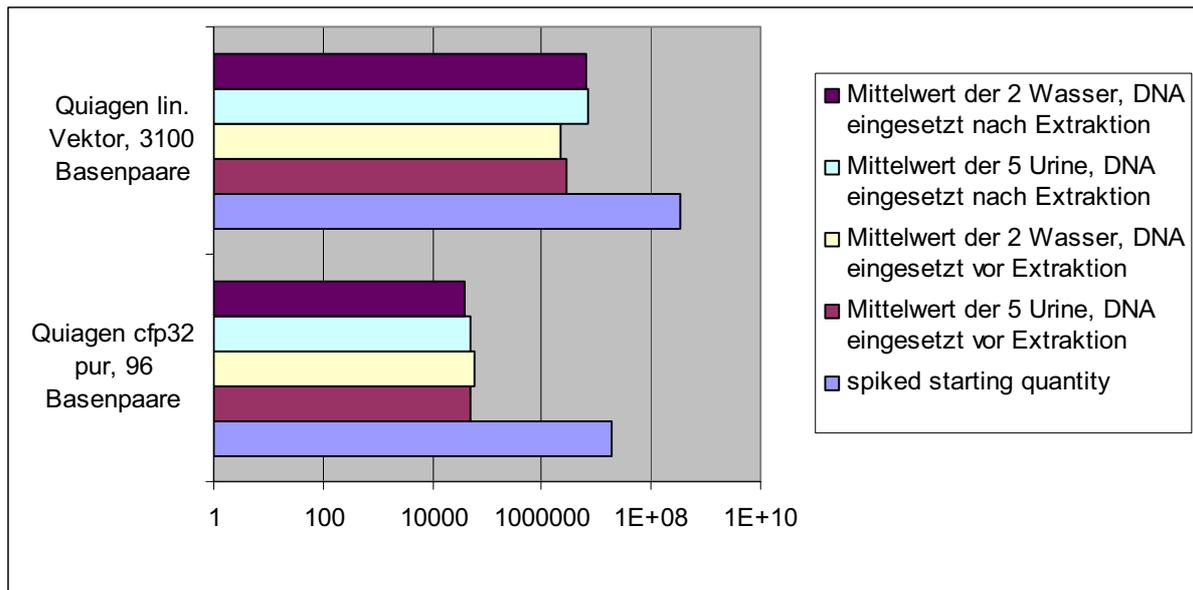


Abbildung 30: Beschreibung äquivalent zu Abbildung 29. Quiagen Extraktionsmethode

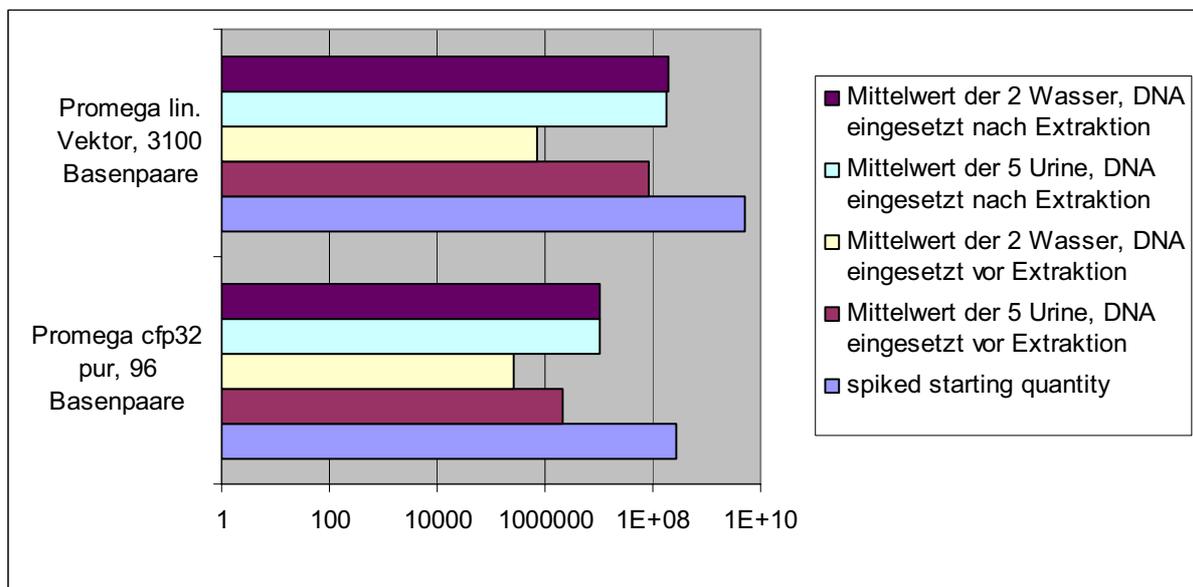


Abbildung 31: Beschreibung äquivalent zu Abbildung 29. Promega Extraktionsmethode

Die Abbildungen 29 bis 31 zeigen, dass sich alle drei Extraktionsmethoden unabhängig von der Größe des eingesetzten DNA-Stücks ähnlich verhielten. Damit war nun zu erwarten, dass bei klinischen Proben die transrenale DNA im Bereich zwischen 100 und 3000 Basenpaaren extrahiert würde.

## 5.5 Evaluation an klinischen Proben

Insgesamt wurden bei 78 Patienten 78 Urinproben und 153 Sputumproben gesammelt. Bis auf zwei Ausnahmen standen bei jedem Patienten zwei Sputumproben zur Verfügung, von denen jeweils eine Löwenstein-Jensen-Kultur

und ein Ausstrichpräparat angefertigt wurden. Es gab 13 Patienten, bei denen mikrobiologisch eine Tuberkulose gesichert werden konnte. Dies war der Fall, wenn mindestens die LJ-Kultur, also der Goldstandard, einer Sputumprobe positiv wurde. 65 Patienten hatten nach dieser Definition keine Tuberkulose. An allen Urinproben, von denen pro Patient eine zur Verfügung stand, wurde die quantitative PCR angewandt und bei einem Ergebnis  $>0$  (Kopienzahl) als positiv gewertet.

Alle Daten für Kultur und Ausstrich wurden erst nach Beendigung der PCR-Experimente für die Auswertung zugänglich gemacht, so dass diesbezüglich eine einseitige Verblindung bestand.

### 5.5.1 Analyse der qualitativen Testaussage

Die folgende Liste unterscheidet primär die beiden Patientengruppen mit mikrobiologisch bestätigter (A,  $n=13$ ) und nicht bestätigter (B,  $n=65$ ) Tuberkulose. In der Gruppe der Patienten mit mikrobiologisch bestätigter Tuberkulose (A) gibt es folgende Subgruppen:

A1, in der die LJ-Kulturen aus beiden Sputen ein positives Ergebnis zeigten,

A2, in der sowohl der Ausstrich als auch die Kultur von mindestens einer der Proben positiv waren,

A3, in der zwar mindestens einmal der Goldstandard positiv war, der Sputumausstrich beider Proben allerdings negativ. (vgl. unterschiedliche Nachweisgrenzen für Sputum und Kultur in Kapitel 2.4.1).

Gruppe	TB Diagnose	Patienten	PCR+	PCR-
A Mikrobiologisch bestätigte TB	A1: alle LJ-Kulturen positiv	11	6 (54,5%)	5 (45,5%)
	A2: LJ min. 1x pos. und AFB min. 1x pos.	10	7 (70%)	3 (30%)
	A3: LJ min. 1x pos. und AFP 2x negativ	3	1 (33,3%)	2 (66,7%)
B Kein mikrobiologischer Nachweis von TB	B: LJ und AFB negativ	65	40 (61,5%)	25 (38,5%)

Zur Berechnung der diagnostischen Aussagekraft des angewandten Testverfahrens wird ein mit Tuberkulose diagnostizierter Patient als positiv bezeichnet, wenn mindestens eine positive LJ-Kultur gefunden wurde. Tabelle A3

(siehe Anhang) zeigt die Sputum-, Kultur- und PCR-Ergebnisse aller mikrobiologisch bestätigten TB-Fälle.

	Mikrobiologisch Tuberkulose	Mikrobiologisch keine Tuberkulose
PCR +	8 (61,5%)	40 (61,5%)
PCR -	5 (38,5%)	25 (38,5%)
	13 (100%)	65 (100%)

Abbildung 32: Vierfeldertafel aus den Ergebnissen der klinischen Proben

Für die angewandte PCR beträgt die Sensitivität 61,5%, die Spezifität 38,5%. Der positive prädiktive Wert liegt bei 16,7%, der negative prädiktive Wert bei 83,3%.

### 5.5.2 Analyse der quantitativen Werte

Die folgende Abbildung (Abbildung 33) zeigt die Verteilung der quantitativen PCR-Werte bei den positiven Ergebnissen in Abhängigkeit von mikrobiologisch bestätigter vs. nicht bestätigter TB.

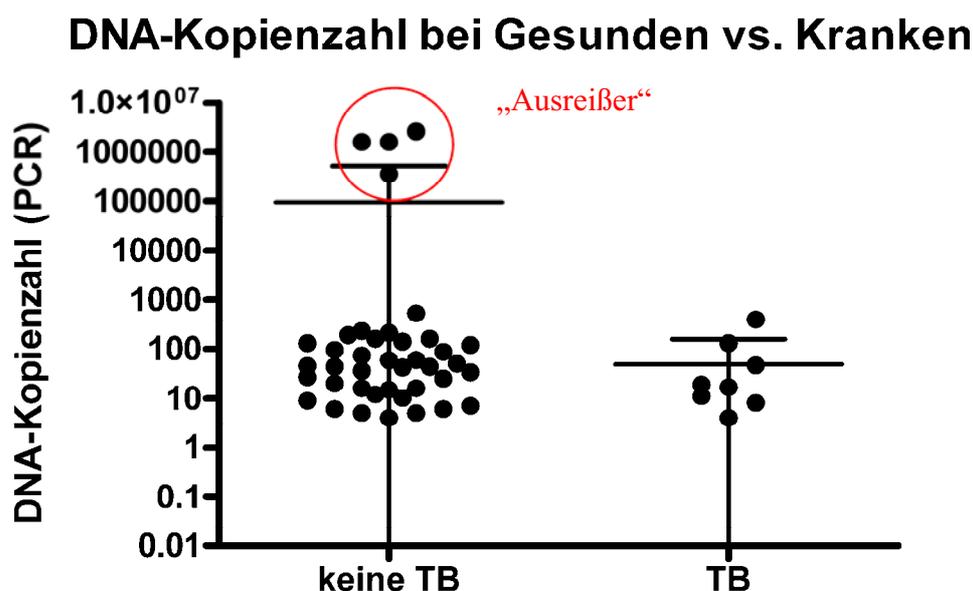


Abbildung 33: Verteilung der Werte für die Anzahl an DNA-Kopien in der PCR bei Gesunden (mikrobiologisch kein Nachweis von TB) vs. Kranken (mikrobiologisch bestätigte TB); Mittelwerte mit Standardabweichung.

Die meisten falsch positiven Werte befinden sich unterhalb von 250 Kopien. Würde man diesen Wert allerdings als cut-off nehmen um die Spezifität zu erhöhen, hätte man keine richtig positiven Ergebnisse mehr. Alle richtig positiven Werte sind unterhalb von 250 Kopien.

Die vier falsch positiven Werte, die den Bereich bis 600 Kopien deutlich überschreiten („Ausreißer“) haben Kopienzahlen von  $3,6 \times 10^5$ ,  $1,6 \times 10^6$ ,  $1,6 \times 10^6$  und  $2,6 \times 10^6$ .

### 5.5.3 Abhängigkeit der Testperformance vom Patientengeschlecht

Bei 73 Patienten war eine Geschlechtszuordnung der Namen möglich und somit ein Vergleich der Ergebnisse bei weiblichen und männlichen Patienten.

Weiblich	Mikrobiol. TB	Keine TB	Männlich	Mikrobiol. TB	Keine TB
PCR +	4 (44,4%)	23 (62,2%)	PCR +	3 (100%)	15 (62,5%)
PCR -	5 (55,6%)	14 (37,8%)	PCR -	0 (0%)	9 (37,5%)
	9 (100%)	37 (100%)		3 (100%)	24 (100%)

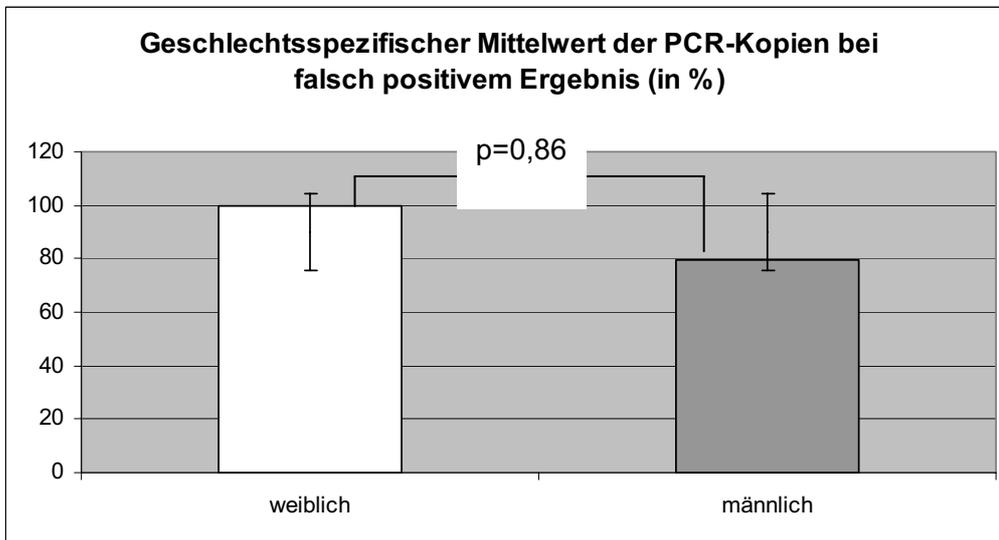
Abbildung 34: Ergebnisse der klinischen Proben, getrennt nach weiblichen und männlichen Studienteilnehmern

Für Patientinnen ergeben sich folgende Werte zur Testqualität: Sensitivität = 44,4%, Spezifität = 37,8%, Positiver prädiktiver Wert = 14,8%, Negativer prädiktiver Wert = 73,7%. Für Patienten lauten sie: Sensitivität = 100%, Spezifität = 37,5%, Positiver prädiktiver Wert = 16,6%, Negativer prädiktiver Wert = 100%

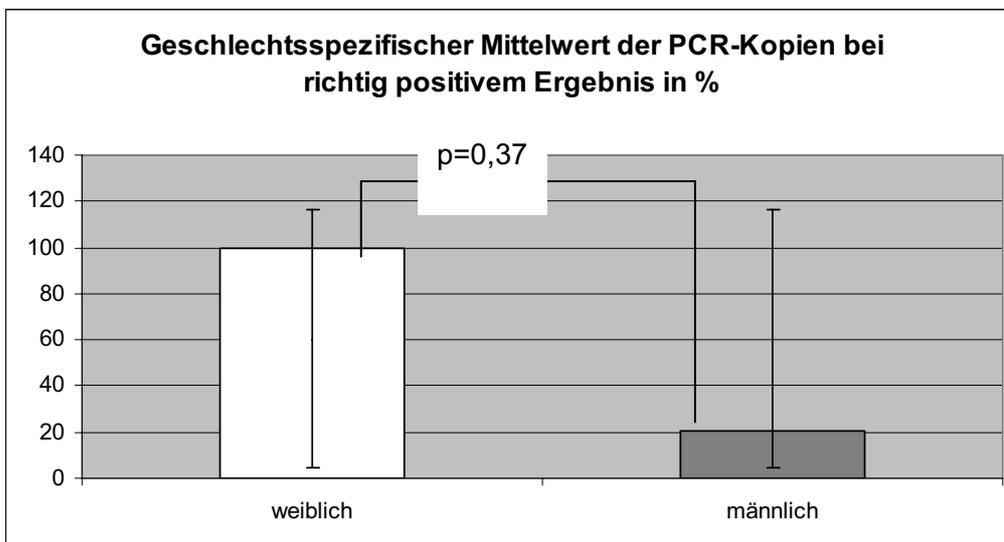
Am auffälligsten ist die hohe Sensitivität und der hohe negative prädiktive Wert (beide 100%) bei männlichen Probanden im Vergleich zu weiblichen.

Mittels t-Test lässt sich ein p-Wert von 0,425 insgesamt zwischen der männlichen und weiblichen Gruppe berechnen. Dies zeigt, dass die Nullhypothese, die Gleichheit beider Gruppen, nicht verworfen werden kann.

Für die Verteilung der Kopienanzahl bei falsch (siehe Abb. 35) und richtig positivem Ergebnis (siehe Abb. 36) ergeben sich ähnlich hohe p-Werte, die somit keinen signifikanten Unterschied zwischen weiblichen und männlichen Patienten signalisieren. Hinzu kommen hohe Standardabweichungen vom Mittelwert.



**Abbildung 35: Mittelwert der DNA-Kopienzahl in der PCR bei weiblichen und männlichen Urinen mit falsch positivem Ergebnis, weiblicher Mittelwert 100% gesetzt; p-Wert 0,86**



**Abbildung 36: Mittelwert der DNA-Kopienzahl in der PCR bei weiblichen und männlichen Urinen mit richtig positivem Ergebnis, weiblicher Mittelwert 100% gesetzt; p-Wert 0,37**

## 6 Diskussion

In dieser Arbeit ist es gelungen, mittels Erstellung einer Standardkurve eine quantitative real-time PCR zur Amplifizierung eines für Tuberkulose-Erreger spezifischen Genabschnitts des Gens *cfp32* zu entwickeln. Des Weiteren wurden systematisch drei DNA-Extraktionsmethoden auf die Anwendbarkeit an Urinproben getestet. Dabei stellte sich die Guanidinisothiocyanat/Promega Wizard<sup>®</sup> Methode als besonders geeignet heraus und wurde an 78 Urinproben von Patienten mit Verdacht auf Tuberkulose angewandt. Mittels der entwickelten PCR konnte erreicht werden, dass zu diesen Urinen Aussagen über die Anzahl an vorhandenen DNA-Kopien gemacht werden können. Besonders auffällig waren hier vier Urine, die fünf- und sechsstelligen Zahlen an *cfp32*-Kopien aufwiesen.

### 6.1 Überlegungen zu physiologischen und pathophysiologischen Aspekten

Desoxyribonukleinsäure, DNA oder DNS, der Träger der Erbinformation, besteht im menschlichen Körper aus den Nukleotiden. Deren individuelle Strukturelemente sind die Purinbasen (Adenin, Guanin) und die Pyrimidinbasen (Cytosin, Thymin). Das Polynukleotid DNA wird intrazellulär durch Nukleinsäure abbauende Enzyme, den Nukleasen, in Mononukleotide umgewandelt, die wiederverwertet oder weiter abgebaut werden. Während der Abbau von Pyrimidinnukleotiden noch nicht ganz verstanden ist, weiß man, dass die Purinnukleotide zur Harnsäure abgebaut und in den Urin ausgeschieden werden<sup>64</sup>. Wie könnte transrenale Tuberkulose-DNA, also Tuberkulose-DNA im Urin, auftreten? Die DNA müsste dem intrazellulären Abbau des Tuberkelbakteriums entkommen sein. Vorstellbar ist der Zerfall des ganzen Bakteriums durch einen programmierten Zelltod oder eine Zerstörung durch das Immunsystem. Denkbar wäre hypothetisch auch eine aktive Sekretion von DNA durch das Mykobakterium. Einmal außerhalb der Zelle, würde sich die DNA im Blut, im Gewebe oder in der Lymphe befinden und müsste zur Niere und in den Harn gelangt sein, ohne auf dem Weg abgebaut worden zu sein.

Den ersten Bericht über zirkulierende DNA lieferten 1948 Mendel und Metais. Seitdem wurde über den Ursprung der zirkulierenden DNA viel diskutiert.

Hohe DNA-Level im Blut wurden bereits beim Systemischen Lupus erythematoses<sup>59,90</sup>, Tumoren, fetaler DNA in maternalem Plasma und bei Infektionskrankheiten gefunden<sup>27,96</sup>.

Einige Autoren sehen den Ursprung der zirkulierenden DNA in Apoptose und Nekrose<sup>53,58</sup>. Diese Meinungen basieren allerdings vor allem auf Untersuchungen an Tumorkranken und freigesetzter Tumor-DNA im Blut.

Mehrere Studien haben gezeigt, dass sich DNA-Fragmente auf der Oberfläche von Blutzellen befinden<sup>61</sup>. Allerdings konnte noch nicht eindeutig geklärt werden, ob es sich hier um DNA handelt, die in die Zelle aufgenommen wird oder ob sie die Zelle verlässt.

Gahan<sup>41</sup> beschreibt, dass es Hinweise gibt, dass DNA-Frakturen spontan von sich teilenden und nicht-teilenden lebenden Zellen abgegeben werden und von anderen Zellen aufgenommen werden. So könnte es eine Möglichkeit sein, dass zirkulierende DNA von lebenden Tuberkelbakterien aktiv aus den Zellen sezerniert wurde. Denkbar wäre eine ähnliche Form wie die Konjugation, ein Sexualvorgang von Bakterien, bei dem Erbgut übertragen wird. Besprochen wurde, dass es sich bei der freigesetzten DNA um eine besondere Form der DNA handeln könnte<sup>40</sup>. Bei Bakterien wird die DNA in Zusammenhang mit Glykolipoproteinkomplexen gebracht, die RNA und DNA-Polymerasen enthalten und gleichzeitig freigesetzt werden. Interessant ist hier, ob diese DNA besondere Aufgaben besitzt oder durch spezielle Mechanismen dem Abbau durch Nukleasen entgehen kann. Würde man Mechanismen kennen, durch die zirkulierende DNA wirklich entsteht, könnte man den biologischen Sinn darin besser verstehen. Letztendlich würde ein ständiges Anbieten von DNA-Stücken aus dem eigenen Genom bestimmter oder aller Organismen an andere bzw. von Zellen an andere einen Evolutionsdruck erzeugen, der auch das Überleben von Bakterien, Viren und Tumorzellen durch die Weitergabe von Resistenzgenen erklären könnte. Damit ist ein weiteres Verständnis über die zirkulierende DNA auch für die Therapie von Infektionskrankheiten und Tumorerkrankungen sehr wichtig. Auch kann spekuliert werden, dass ein ständiger Austausch von Erbinformationen nicht immer erwünscht wäre und deshalb Zellen über Kontrollmechanismen des eigenen Genoms verfügen und die Integration neuer DNA genauer Prüfung unterzogen wird bzw. in eine evolutionäre Sackgasse führen würde.

Was sind mögliche Mechanismen, wie DNA in den Urin gelangt?

Der Filter der Niere besteht aus drei Schichten:

- dem Endothel, dessen Poren einen Durchmesser von 50-100nm besitzen;
- der dreischichtigen Basalmembran mit negativ geladenen Glykosaminoglykanen
- dem Epithel der Bowman-Kapsel.

Bedingt durch diesen Filter können nur Moleküle frei filtriert werden, deren Radius kleiner als 1,6-1,8nm ist. Dies entspricht einer Molekülmasse von 6-15 kDa. Bis zu einer Molekülgröße von 80 kDa werden Stoffe nur teilweise filtriert, abhängig von der Ladung und der Porenweite. Neutrale und positiv geladene Moleküle überwinden leichter die Filterbarriere, da die Wandladungen der Basalmembran negativ sind. Ladung und Porenweite können sich unter pathophysiologischen Umständen ändern. Beispielsweise sind bei einer Minimal-Change-Nephropathie die Wandladungen vermindert. Bei Glomerulonephritiden können die Poren sogar so weit werden, dass Erythrozyten im Urin gefunden werden (Erythrozytenzylinder)<sup>83</sup>. Damit könnten die vier „falsch positiven“ Samples mit den hohen Kopienzahlen einer Nierenpathologie geschuldet sein. Für künftige Studien wären deswegen laborchemische Untersuchungen der Urinproben von großem Nutzen, um eine bestehende Membranstörung erfassen zu können. Dazu würden sich Harnteststreifen, die semiquantitative Aussagen über Proteinurie, Glukosurie, Ketonurie, Leukozyturie und Bakteriurie liefern können, die mikroskopische Untersuchung des Urinsediments und die Bestimmung der Nierenretentionsparameter im Blut eignen.

Zusammenfassend bezogen auf das diese Arbeit umfassende Experiment könnte der cfp 32 Genabschnitt mit 95 Basenpaaren=57 kDa teilweise filtriert werden, in höherem Maße bei Patienten mit einer Nierenschädigung.

Es stellt sich auch die Frage nach der Wahrscheinlichkeit, mit der gerade das DNA-Stück erhalten bleiben würde, das die hier entwickelte rt-PCR detektiert, weil es spezifisch für den Mycobacterium Tuberkulose Komplex ist. So könnten individuelle Faktoren im Immunsystem der Patienten (Immunantwort auf Tuberkulose, stadienabhängig) die Ausscheidung gerade dieses DNA-Stücks beeinflussen. Ginge man von der Hypothese aus, dass die Tuberkelbakterien selbst DNA aus ihren Zellen ausschleusen, könnte es darin Unterschiede in verschiedenen Stämmen der Tuberkelbakterien geben, die jeweils individuell

unterschiedliche DNA-Abschnitte ausschleusen. Möglicherweise könnte die Detektion auf mehrere Genabschnitte die Sensitivität der Methode erhöhen. Andererseits könnten bei einem negativen Ergebnis auch Rückschlüsse auf die Immunantwort, das Stadium der Erkrankung oder die Infektion mit einem DNA-ausschleusendem oder nicht-ausschleusendem Bakterium gezogen werden. Hier könnten wiederum Korrelationen zu den klinischen Verläufen einer Infektion gezogen werden.

Zu überlegen gilt, ob es Stadien der Tuberkulose gibt, in denen überhaupt keine DNA ins Blut gelangen kann, weil die Tuberkelbakterien in den verkalkten Kavernen abgekapselt sind, nur Anschluss an das bronchiale System haben oder immunologisch vom Rest des Körpers ferngehalten werden. Dies könnte erklären, warum einige Proben positiv in Kultur und Sputumausstrich waren, aber negativ in der rt-PCR bzw. in allen drei Verfahren negativ waren (bei stummer TB). Die primäre Immunreaktion bei Tuberkulose ist die Verdauung von Tuberkelbakterien durch Makrophagen. Diese präsentieren Tuberkulose-Antigenstücke (Proteine, keine DNA) mittels MHC II-Molekülen auf ihrer Oberfläche den TH1-T-Helferzellen, die wiederum proliferieren, Zytokine produzieren und damit Lymphozyten und Makrophagen in das betroffene Gewebe anlocken. Ein Teil der so ins Gewebe eingewanderten Makrophagen tötet Tuberkelbakterien ab, ein anderer Teil wandelt sich in Epitheloidzellen oder Langerhans'sche Riesenzellen um, um so die Tuberkelbakterien abzukapseln<sup>19</sup>.

Die vier falsch positiven Werte mit den hohen Kopienzahlen (oben auch „Ausreißer“) sind aufgrund der Experimente nur schwerlich als falsch anzusehen, sondern vielmehr als reelle Nachweise zu postulieren. Sie könnten auf ein hohes Vorkommen von Tuberkulose-DNA im Blut und - da Kultur und Sputumausstrich negativ waren - auf eine extrapulmonale Tuberkulose schließen lassen. Deshalb wäre weiter zu prüfen, ob dem hier vorgestellten Test ein sinnvoller diagnostischer Einsatz bei extrapulmonaler Tuberkulose zukommen könnte. Dazu müssten Patienten mit hoher Kopienzahl im Urin klinisch weiter verfolgt werden.

## **6.2 Methodische Aspekte**

Die klinischen Proben aus Tansania wurden standardisiert gesammelt. Das medizinische Personal wurde in einer Trainingsphase in der Verarbeitung der Sputum- und Urinproben geschult. Allerdings muss bedacht werden, dass die

Samples nicht sofort nach Abnahme auf  $-80\text{ °C}$  gefroren werden konnten. Auf dem Transport von Tansania nach Deutschland wurden die Urinproben von einer Mitarbeiterin des Münchner Tropeninstituts begleitet. Die Kühlung der Proben wurde mit Trockeneis sichergestellt, das auf dem Weg von der Stadt Mbeya in die tansanische Hauptstadt Daressalam einmal nachgefüllt werden musste. Nach Ankunft wurden die Proben sofort auf  $-20\text{ °C}$  gebracht und am nächsten Tag auf  $-80\text{ °C}$  gekühlt. Es bleibt insgesamt schwierig zu beurteilen, wie anfällig kurze transrenale DNA gegenüber einem Abbau oder einer Konformationsänderung bei Temperaturschwankungen ist und welche möglichen Auswirkungen dies auf die Ergebnisse der PCR haben könnte. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Abbau von DNA im Urin durch mehrere Maßnahmen versucht zu verhindern: durch Zugabe der Stabilisatoren EDTA und TrisHCl und schnelle Kühlung. Eine komplette zeitnahe Verarbeitung der Proben scheint jedoch sinnvoll und würde am ehesten den realistischen Bedingungen entsprechen.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine erhebliche Variabilität an DNA-Gehalt im Urin nach Lagerung herrscht. Die Unterschiede in der Degradierung der DNA nach unterschiedlichen Zeitpunkten konnten jedoch am besten mit verschiedenen Ländern, in denen der Urin gesammelt wurde (hier Italien und Zambia) korreliert werden. Die Zugabe von EDTA und das Lagern bei unterschiedlich kühlen Temperaturen hatte nicht immer den gewünschten Effekt einer längeren Stabilisierung der DNA. Somit wird empfohlen, die Lagerung dem vorher zu prüfendem Verhalten des Urins anzupassen<sup>25</sup>.

Die Inhibierung der real-time PCR durch individuelle Faktoren im Sample-Material wurde bereits in einigen Publikationen besprochen<sup>24,52,60</sup>. Huggett et al. beschreiben die komplette Inhibierung der real-time PCR, wenn 20 bzw. 40% des PCR-Ansatzes aus unextrahiertem Urin bestehen. Auch der Einsatz von 4mM EDTA inhibiert die komplette Reaktion. Die vorgestellten Daten zeigen jedoch keine Konsistenz der Inhibierung unter verschiedenen PCR-Reaktionen und unter verschiedenen Samples. Auch in dem in dieser Arbeit vorgestellten Experiment konnte beim Vergleich der drei Extraktionsmethoden eine große Varianz bezüglich der Extraktion aus den fünf unterschiedlichen Urinsamples festgestellt werden. In Zukunft ist es deshalb wichtig die zuverlässige Entfernung von Inhibitoren in klinischen Samples sichern zu können.

In der Literatur wurden keine zufriedenstellenden Angaben zur „bacterial load“ von Tuberkelbakterien gefunden. In einer in Brasilien durchgeführten Studie<sup>73</sup> wurden bei neu mit Tuberkulose diagnostizierten Patienten quantitative Kulturen aus dem Sputum angelegt und je nach Schwere der Erkrankung etwa zwischen drei und fünf Colony forming units per ml Sputum nachgewiesen. Dormans et al.<sup>36</sup> benutzten ein Mausmodell: Sie infizierten Mäuse mit 19 verschiedenen Stämmen des *Mycobacterium tuberculosis complex*, entnahmen den Mäusen an mehreren Tagen nach Infektion einen Lungenlappen, homogenisierten diesen und bestimmten in der nachfolgenden Kultur aus 10 µl des homogenisierten Materials die Anzahl der Colony forming units. Die Zahl der Kolonien war bei fast allen Stämmen über  $10^5$ , unterschied sich allerdings je nach Stamm um bis zu vier Log-Stufen. Es bleibt damit schwierig, sich eine Vorstellung über die Anzahl an Tuberkelbakterien etwa in der Lunge, im Blut, im Sputum oder im Urin zu machen, besonders weil es dazu großer Studien bedürfte, um Korrelationen zu Stadien der Tuberkulose, verschiedenen Stämmen von Tuberkulose und den vielfältigen Organbeteiligungen festzustellen. Ob die quantitative PCR dabei helfen kann ist fraglich, da gerade die Vorstellung der Detektion freier zirkulierender DNA nicht auf die tatsächliche Anzahl an Bakterien schließen lassen kann. Auch das Vorhandensein individueller Inhibierungs- und evtl. Enhancing-Faktoren lassen die Interpretation des Ergebnisses der real-time PCR prinzipiell nie als eine absolute quantitative Aussage zu.

Trotz der Veröffentlichungen, die das *cfp32*-Gen als eine konservierte Region in allen Bakterien des *Mycobacterium tuberculosis complex* sehen, kann die Spezifität dieses Gens erst zu 100 % nachgewiesen werden, wenn die Genome aller Organismen sequenziert worden sind und in Gendatenbanken verglichen werden können. Im Besonderen ist darauf hinzuweisen, dass in der in dieser Arbeit verwendeten PCR nur eine Teilsequenz des *cfp32*-Gens amplifiziert wurde und sich dieser Teilabschnitt als nicht spezifisch herausstellen könnte.

### **6.3 Alternativen der DNA-Extraktion**

Der Einsatz unkonventioneller DNA-Extraktionsmethoden könnte im Gegensatz zu den kommerziellen Kits Vorteile bringen: die Verwendung einer größeren Menge Urin und damit eine höhere Wahrscheinlichkeit der DNA-Extraktion (bei Einsatz von einem Liter Urin Erhöhung der eingesetzten DNA-Kopienzahl im Vergleich zu den hier vorgestellten Methoden in der Größenordnung von drei Log-Stufen), Vermeidung der Co-Extraktion von Inhibitoren, Anwendbarkeit auf

andere klinische Samples und einfachere Handhabung. Es werden hier drei Extraktionsmethoden kurz vorgestellt: die Vakuumkonzentration, die Extraktion mit Anionenaustauschern und die elektrophoretische DNA-Extraktion, die einzeln oder kombiniert zum Einsatz kommen könnten:

#### Vakuumkonzentration

Von Herstellern wird beschrieben, dass Vakuumkonzentratoren zur schonenden Aufkonzentrierung von DNA benutzt werden können<sup>16</sup>. Das eingesetzte Volumen kann bis zu mehreren Millilitern reichen und die Konzentrierung bis zur kompletten Trocknung durchgeführt werden. Hierzu wird die Probe mit Strahlungswärme oder Mikrowellen erwärmt. Im Vakuum liegt der Siedepunkt prinzipiell niedriger und so kann der Flüssigkeitsdampf von der Vakuumpumpe abgefangen und in die Kühlfalle geleitet werden.

#### Extraktion mit Anionenaustauschern

Auch einige der hier vorgestellten Methoden basieren auf dem Prinzip des Ionenaustauschs (siehe Kapitel 4.4). Allerdings ist eine Vielzahl von kommerziellen Kits auf dem Markt, die auf dem gleichen System basieren. Hierbei kommt es zu einer Bindung der DNA mit einem Ionentauscher. Diese Bindung wird in einem weiteren Schritt durch ein Überangebot eines günstigeren Bindungspartners wieder gelöst. Ein Beispiel eines starken Anionenaustauschers wäre beispielsweise Q-Sepharose<sup>66</sup>.

Als weiterer theoretischer Vorschlag wäre zu diskutieren, die Elektrophorese zur Isolation von DNA aus Urin bzw. anderen Körperflüssigkeiten im Sinne einer „elektrophoretischen DNA-Extraktion“ zu nutzen. In einen Behälter mit einer großen Urinmenge wird eine Anode (Pluspol) gegeben, der eine Nitrocellulosemembran vorgeschaltet ist. Da DNA negativ geladen ist, wäre davon auszugehen, dass bei Anlegen starken Stroms die DNA von der Anode angezogen und an der Membran gebunden würde. Die Membran müßte danach durch Auswaschen von Proteinen befreit werden und die DNA in Lösung gebracht werden. Somit würden analog der Gelelektrophorese und dem Blotting das Wandern von DNA-Molekülen und Proteinen von der Kathode zur Anode und das Binden an positiv geladene Membranen ausgenutzt. Würde man eine große Menge Urin, z. B. einen Liter Sammelurin nutzen können, würde man die

Wahrscheinlichkeit der Extraktion von kleiner zirkulierender DNA weiter erhöhen. Möglicherweise könnte man durch diese Methode auch die Extraktion von Inhibitoren aus dem Samplmaterial erreichen.

#### **6.4 Aussagekraft der q-rt-PCR**

Eine hohe Sensitivität wird durch eine niedrige Rate falsch negativer Ergebnisse erzielt und schließt damit zu großer Wahrscheinlichkeit eine Krankheit aus. Tests mit hoher Sensitivität werden vor allem zum Screening bei Krankheiten mit niedriger Prävalenz verwendet. Tests mit hoher Spezifität werden als Bestätigungstests nach einem positiven Ergebnis im Screening benutzt, da ein negatives Ergebnis mit hoher Wahrscheinlichkeit auch als wirklich negativ angesehen werden kann. Durch Veränderung des Schwellenwerts (Threshold), hier beispielsweise durch Anheben der Kopienzahl auf >1000 zur Definition als positives Ergebnis, wird bei gleichzeitiger Erhöhung der Spezifität die Sensitivität gemindert. Je niedriger der Threshold umso weniger spezifisch wäre der Test. Um einen optimalen Schwellenwert definieren zu können, bräuchte es eine größere Anzahl an untersuchten Proben. Auffallend sind in diesem Zusammenhang aber wiederum die vier „falsch positiven“ Ausreißer mit den hohen Kopienzahlen, die wohl auf jeden Fall über einem gesetzten Threshold liegen würden.

Die hohe Sensitivität von 100 % bei männlichen Urinen sollte an einem größeren Kollektiv überprüft werden.

Nimmt man die hier gewonnenen Ergebnisse als richtig an, so konnte die entwickelte PCR bei 48 von 78 Proben eine positive Kopienzahl an Tuberkulose-DNA nachweisen, also bei ungefähr 62 % der getesteten Patienten. Es ist aber die Frage zu stellen, welchem klinischen Korrelat eine positive PCR im Urin entsprechen kann. Epidemiologisch scheint dieser Wert nicht aus dem Rahmen zu fallen, da rund zwei Drittel aller Afrikaner einen positiven Mendel-Mantoux-Test haben, also schon einmal einen immunologisch wirksamen Kontakt mit Tuberkulose hatten. Bei dem hier untersuchten Patientenkollektiv handelt es sich ja um Patienten, die sich zum Ausschluss einer Tuberkulose vorgestellt haben und somit sicher eine noch höhere Tuberkuloseprävalenz besitzen. Mit den derzeit verfügbaren diagnostischen Methoden wird bei rund 15-20 % dieser Patienten mikrobiologisch eine Tuberkulose nachgewiesen, bei einem weiteren Drittel wird aufgrund des klinischen Bildes (Röntgen oder weiter bestehende Symptome nach mehrmaliger Antibiotikagabe) eine Tuberkulosetherapie

begonnen. Zu prüfen wäre, was die PCR nachweisen würde – nur eine Infektion oder einen Ausbruch bzw. ein spezielles Stadium der Tuberkulose.

## 6.5 Schlussfolgerungen

Die hier vorgestellte Arbeit untersuchte unter der Annahme des Existierens transrenaler DNA die Möglichkeit, Tuberkulose aus dem Urin zu diagnostizieren. Bei 48 Urinproben von Patienten mit klinischen Symptomen einer Tuberkulose konnte ein positives PCR-Ergebnis festgestellt werden. Nur acht dieser 48 Patienten hatten einen mikrobiologischen Nachweis von Tuberkulose positives Ergebnis der Löwenstein-Jensen Kultur. Die Spezifität dieser Methode zum Nachweis einer aktiven pulmonalen Tuberkulose ist mit 38,5% im Vergleich zum derzeit gültigen Goldstandard (Mikroskopie und Kultur) sehr schlecht. Auch die Sensitivität ist mit 61,5% nicht überragend. Insgesamt stellt sich die Frage, was die entwickelte PCR nachweist. Denkbar ist zum einen eine Kreuzreaktivität mit DNA Sequenzen anderer Erreger, denn wenn die PCR humane DNA nachweisen würde, wäre sie zu nahezu 100% positiv. Andererseits wird eine Urin-PCR auch extrapulmonale TB nachweisen und unter Umständen auch latente TB; es ist also möglich, dass sie doch ein klinisches Korrelat hat. Diese Arbeit stellt somit eine große Diskrepanz zwischen den etablierten Methoden der Tuberkulosedagnostik und der hier entwickelten molekularen Methode fest. Für die Interpretation dieses Ergebnis fehlen jedoch eine große Anzahl an klinischen Proben, spezifische klinische Daten zu den Patienten und ein Follow-up der Patienten. Daher kann sie nur als eine Voruntersuchung zu weiteren größeren klinischen Studien verstanden werden.

Der Nachweis fünf- und sechstelliger Werte des cfp32 Gens in vier Urinen, bei denen weder Sputumausstrich noch Kultur positiv waren, wirft die Frage auf, welche Diagnostikmethode für welche Patienten zu wählen ist.

Somit bleibt zu fragen, ob neben der bekannten Tatsache der hohen Zahl falsch-negativer Sputumausstriche (siehe Tabelle 5, Seite 29), die Löwenstein-Jensen Kultur in jedem Fall als Goldstandard zur Diagnostik von Tuberkulose angesehen werden kann. Auch sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Diagnostik geschlechtsspezifisch angepasst werden sollte.

Es ist abzusehen, dass molekulare Methoden eine weitaus größere Komplexität der Erkrankung Tuberkulose aufdecken könnten. Der Hypothese freier

zirkulierender DNA muss weiter nachgegangen werden, um Verständnis über den potentiellen Nutzen für die Diagnostik und Therapie gewinnen zu können.

## 7 Zusammenfassung

Die Tuberkulose, eine Krankheit, die die Menschheit wahrscheinlich schon seit dem Altertum heimsucht, ist auch heute noch sehr weit verbreitet und stellt in Entwicklungsländern und unter den mit dem HI-Virus infizierten Patienten ein großes Problem dar. Die für die Therapie essentielle Diagnostik beruht besonders unter eingeschränkten technischen Bedingungen noch auf der wenig sensitiven Methode der Anfärbung von säurefesten Stäbchen im Sputumausstrich.

Neuere molekulare Methoden könnten einen Fortschritt im Sinne exakter und schneller Aussagen bezüglich einer Infektion mit Tuberkulose auslösenden Mykobakterien bringen. Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zu testen, die durch Amplifizierung eines Mycobacterium-tuberculosis complex typischen DNA-Abschnitts eine quantitative Aussage über das Vorhandensein von Tuberkulose-DNA im Urin eines Patienten und somit eine diagnostische Aussage erlauben soll. Unter der Annahme frei im Blut zirkulierender DNA, die durch die Niere in den Harn gelangt, sollte die Diagnose von extrapulmonaler Tuberkulose möglich sein und ein relativ einfacher Test für tropische Länder gefunden werden.

Nach Optimierungsschritten der Polymerasekettenreaktion wurden drei etablierte DNA-Extraktionsmethoden Puregene DNA Purification Kit (Gentra Systems), QIAamp DNA Mini Kit (Quiagen), Wizard® Plus Minipreps (Promega) in Hinblick auf die DNA-Ausbeute verglichen. Die modifizierte Methode von Promega stellte sich als geeignet heraus und wurde an 78 Urinproben aus Tansania angewandt, die von Patienten mit klinischem Verdacht auf Tuberkulose stammten. Gleichzeitig wurde bei diesen Patienten im Projekt in Tansania ein Ausstrichpräparat aus dem Sputum und eine Löwenstein-Jensen Kultur aus dem Sputum angelegt und ausgewertet. Hierbei waren zehn Patienten in Ausstrich und Kultur positiv sowie drei Patienten nur in Kultur positiv. Bei einem Vergleich dieser Ergebnisse mit den Ergebnissen der PCR ergab sich eine Sensitivität von 61,5% und eine Spezifität von 38,5 % für die neu entwickelte Methode. Aufgrund der beschränkten diagnostischen Möglichkeiten in Tansania war es nicht möglich, bei den Patienten mit falsch positiver Urin-PCR eine latente oder extrapulmonale Tuberkulose auszuschließen und so weitere Erkenntnisse über die klinische Relevanz der neu entwickelten Methode zu gewinnen.



## 8 Literaturverzeichnis

1. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1376-95.
2. Diagnostics for tuberculosis: Global demand and market potential: WHO, 2006.
3. Emergence of Mycobacterium tuberculosis with extensive resistance to second-line drugs--worldwide, 2000-2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2006;55:301-5.
4. The Executive Summary of The Global Burden of Disease and Injury Series [Burden of Disease Unit, Center for Population and Development Studies at the Harvard School of Public Health]. Available from: [http://www.hsph.harvard.edu/organizations/bdu/GBDseries\\_files/gbdsum1.pdf](http://www.hsph.harvard.edu/organizations/bdu/GBDseries_files/gbdsum1.pdf). Accessed 08.11.2006.
5. An expanded DOTS framework for effective tuberculosis control. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002;6:378-88.
6. Find Diagnostics homepage. Available from: [http://www.finddiagnostics.org/about/mission\\_vision.shtml](http://www.finddiagnostics.org/about/mission_vision.shtml). Accessed 07.11.2006.
7. The Global Plan to Stop TB 2006-2015. Geneva: WHO, 2006:16.
8. The Global Plan to Stop TB, 2006-2015. actions for life: towards a world free of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006;10:240-1.
9. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2006. Geneva: World Health Organization (WHO/HTM/TB/2006.362).
10. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2009. Geneva: World Health Organization (WHO/HTM/TB/2009.411).
11. Laboratory XDR-TB definitions. Meeting of the Global XDR TB Task Force. Geneva: WHO, 2006.
12. Mbeya Medical Research Programme. Available from: [http://www.mmrp.org/index.php?option=com\\_content&task=section&id=13&Itemid=32](http://www.mmrp.org/index.php?option=com_content&task=section&id=13&Itemid=32). Accessed 02.01.2007.

13. The Millennium Development Goals and the United Nations Role [United Nations Department of Public Information], 2002. Available from: <http://www.un.org/millenniumgoals/MDGs-FACTSHEET1.pdf>. Accessed 05.11.2006.
14. Millennium Goals for TB [WHO]. Available from: [http://www.who.int/tb/country/mdgs\\_for\\_tb/en/](http://www.who.int/tb/country/mdgs_for_tb/en/). Accessed 05.11.2006, 2006.
15. Tuberculosis Fact Sheet: WHO, 2006.
16. Vakuumpkonzentrator zum Verdampfen, Konzentrieren und Trocknen – HPLC – Aminosäuren – Enzyme. Available from: <http://www.h-saur.com/prod08.htm>. Accessed 19th Nov 2008.
17. Aceti A, Zanetti S, Mura MS, et al. Identification of HIV patients with active pulmonary tuberculosis using urine based polymerase chain reaction assay. *Thorax* 1999;54:145-6.
18. Andersen P. TB vaccines: progress and problems. *Trends Immunol* 2001;22:160-8.
19. Arthur Schneider PS. Respiratory System. In Schneider S ed. *Pathology*. Philadelphia, Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2006:208-9.
20. Blumberg HM, Burman WJ, Chaisson RE, et al. American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America: treatment of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:603-62.
21. Boehme C, Molokova E, Minja F, et al. Detection of mycobacterial lipoarabinomannan with an antigen-capture ELISA in unprocessed urine of Tanzanian patients with suspected tuberculosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2005;99:893-900.
22. Botezatu I, Serdyuk O, Potapova G, et al. Genetic analysis of DNA excreted in urine: a new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in an organism. *Clin Chem* 2000;46:1078-84.
23. Braun J, Renz-Polster H. Tuberkulose. In Renz-Polster H, Krautzig S, Braun J eds. *Basislehrbuch Innere Medizin*. München Jena: Urban&Fischer, 2004:468-73.
24. Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech* 2004;15:155-66.
25. Cannas A, Kalunga G, Green C, et al. Implications of storing urinary DNA from different populations for molecular analyses. *PLoS One* 2009;4:e6985.

26. Chan ED, Reves R, Belisle JT, et al. Diagnosis of tuberculosis by a visually detectable immunoassay for lipoarabinomannan. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1713-9.
27. Chiu RW, Lo YM. The biology and diagnostic applications of fetal DNA and RNA in maternal plasma. *Curr Top Dev Biol* 2004;61:81-111.
28. Codecasa L, Mantegani P, Galli L, et al. An in-house RD1-based enzyme-linked immunospot-gamma interferon assay instead of the tuberculin skin test for diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Clin Microbiol* 2006;44:1944-50.
29. Corbett EL, Watt CJ, Walker N, et al. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch Intern Med* 2003;163:1009-21.
30. Daniel TM. The early history of tuberculosis in central East Africa: insights from the clinical records of the first twenty years of Mengo Hospital and review of relevant literature. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998;2:784-90.
31. Davies PD, Pai M. The diagnosis and misdiagnosis of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008;12:1226-34.
32. Des Prez RM, Heim CR. *Mycobacterium tuberculosis*. In Mandell, Douglas, Bennett eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Third Edition ed. New York: Churchill Livingstone, 1990:1877-81.
33. Dheda K, Smit RZ, Badri M, et al. T-cell interferon-gamma release assays for the rapid immunodiagnosis of tuberculosis: clinical utility in high-burden vs. low-burden settings. *Curr Opin Pulm Med* 2009;15:188-200.
34. Doetsch RN. Benjamin Marten and his "New Theory of Consumptions". *Microbiol Rev* 1978;42:521-8.
35. Doherty TM, Rook G. Progress and hindrances in tuberculosis vaccine development. *Lancet* 2006;367:947-9.
36. Dormans J, Burger M, Aguilar D, et al. Correlation of virulence, lung pathology, bacterial load and delayed type hypersensitivity responses after infection with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in a BALB/c mouse model. *Clin Exp Immunol* 2004;137:460-8.
37. Eichenlaub D. Tuberkulose und nichttuberkulöse Mykobakteriosen. In Lang W, Löscher T eds. *Tropenmedizin in Klinik und Praxis*. Stuttgart: Thieme, 2000:253-62.

38. Elliott AM, Namaambo K, Allen BW, et al. Negative sputum smear results in HIV-positive patients with pulmonary tuberculosis in Lusaka, Zambia. *Tuber Lung Dis* 1993;74:191-4.
39. Fontana D, Pozzi E, Porpiglia F, et al. Rapid identification of Mycobacterium tuberculosis complex on urine samples by Gen-Probe amplification test. *Urol Res* 1997;25:391-4.
40. Gahan PB, Anker P, Stroun M. Metabolic DNA as the origin of spontaneously released DNA? *Ann N Y Acad Sci* 2008;1137:7-17.
41. Gahan PB, Swaminathan R. Circulating nucleic acids in plasma and serum. Recent developments. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1137:1-6.
42. Gandhi RN, Moll A, Sturm AW, et al. Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area in South Africa. *Lancet* 2006;368:1575-80.
43. Gothi GD. Natural History of Tuberculosis. *Supplement to the Indian Journal of Tuberculosis* 1978;XXV No.2.
44. Hamasur B, Bruchfeld J, Haile M, et al. Rapid diagnosis of tuberculosis by detection of mycobacterial lipoarabinomannan in urine. *J Microbiol Methods* 2001;45:41-52.
45. Harries AD, Dye C. Tuberculosis. *Ann Trop Med Parasitol* 2006;100:415-31.
46. Herbert H, Rüdiger D. Mykobakterien. In Alexander B, Konstantin B eds. *Medizinische Mikrobiologie*. Stuttgart: Thieme, 2005:348-57.
47. Herzog H. History of tuberculosis. *Respiration* 1998;65:5-15.
48. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 1993;11:1026-30.
49. Hölscher M. Neue Diagnostika zum Nachweis von TB im Urin und Sputum (Vortrag), 2006.
50. Huard RC, Chitale S, Leung M, et al. The Mycobacterium tuberculosis complex-restricted gene cfp32 encodes an expressed protein that is detectable in tuberculosis patients and is positively correlated with pulmonary interleukin-10. *Infect Immun* 2003;71:6871-83.
51. Huggett JF, McHugh TD, Zumla A. Tuberculosis: amplification-based clinical diagnostic techniques. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:1407-12.

52. Huggett JF, Novak T, Garson JA, et al. Differential susceptibility of PCR reactions to inhibitors: an important and unrecognised phenomenon. *BMC Res Notes* 2008;1:70.
53. Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001;61:1659-65.
54. Javad Ghenaat AO, Kiarash Ghazvini, Hossein Ayatollahi, Amir Hossein Jafarian, Minoo Erfanian, Mohammad Taghi Shakeri, Mahmoud Bagheri, Hooman Tavassolian. Comparison of Multiplex PCR and Acid fast and Auramine-Rhodamine staining for detection of Mycobacterium tuberculosis and nontuberculosis Mycobacteria in Paraffin- Embedded pleural and bronchial tissues with granulomatous inflammation and caseous necrosis [The Internet Journal of Microbiology], 2007. Available from: <http://www.ispub.com/ostia/index.php?xmlPrinter=true&xmlFilePath=journals/ijmb/vol4n1/pcr.xml>. Accessed 26.11.2008, 2008.
55. Jones BE, Young SM, Antoniskis D, et al. Relationship of the manifestations of tuberculosis to CD4 cell counts in patients with human immunodeficiency virus infection. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:1292-7.
56. Jordan-Harder B, Maboko L, Mmbando D, et al. Thirteen years HIV-1 sentinel surveillance and indicators for behavioural change suggest impact of programme activities in south-west Tanzania. *Aids* 2004;18:287-94.
57. Kafwabulula M, Ahmed K, Nagatake T, et al. Evaluation of PCR-based methods for the diagnosis of tuberculosis by identification of mycobacterial DNA in urine samples. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002;6:732-7.
58. Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, et al. Cell death: apoptosis versus necrosis (review). *Int J Oncol* 2002;21:165-70.
59. Koffler D, Agnello V, Winchester R, et al. The occurrence of single-stranded DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus and other diseases. *J Clin Invest* 1973;52:198-204.
60. Kontanis EJ, Reed FA. Evaluation of real-time PCR amplification efficiencies to detect PCR inhibitors. *J Forensic Sci* 2006;51:795-804.
61. Laktionov PP, Tamkovich SN, Rykova EY, et al. Cell-surface-bound nucleic acids: Free and cell-surface-bound nucleic acids in blood of healthy donors and breast cancer patients. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1022:221-7.

62. Lambregts-van Weezenbeek KS, Reichman LB. DOTS and DOTS-Plus: what's in a name. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;4:995-6.
63. Lichtenstein AV, Melkonyan HS, Tomei LD, et al. Circulating nucleic acids and apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 2001;945:239-49.
64. Löffler G. Stoffwechsel der Purine und Pyrimidine. In Löffler P ed. *Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2003:629-47.
65. Mathers CD, Lancar D. Updated projections of global mortality and burden of disease, 2002-2030: data sources, methods and results., 2005. Available from: <http://www.who.int/healthinfo/statistics/bodprojectionspaper.pdf>. Accessed 05.11.2006.
66. Melkonyan HS, Feaver WJ, Meyer E, et al. Transrenal nucleic acids: from proof of principle to clinical tests. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1137:73-81.
67. Milde A, Haas-Rochholz H, Kaatsch HJ. Improved DNA typing of human urine by adding EDTA. *Int J Legal Med* 1999;112:209-10.
68. Ministry of Health and Social Welfare URoT. National Tuberculosis and Leprosy Programme. *Annual Report*. 2006.
69. Naumann L. Tuberkulose. In Braun R. BG-D, Fröhlich E., Nothdurft H. D. ed. *Reise- und Tropenmedizin*. Stuttgart, New York: Schattauer, 2005:121-3.
70. Noordhoek GT, Kolk AH, Bjune G, et al. Sensitivity and specificity of PCR for detection of Mycobacterium tuberculosis: a blind comparison study among seven laboratories. *J Clin Microbiol* 1994;32:277-84.
71. Onyebujoh P, Rodriguez W, Mwaba P. Priorities in tuberculosis research. *Lancet* 2006;367:940-2.
72. Pai M. Alternatives to the tuberculin skin test: interferon-gamma assays in the diagnosis of mycobacterium tuberculosis infection. *Indian J Med Microbiol* 2005;23:151-8.
73. Palaci M, Dietze R, Hadad DJ, et al. Cavitory disease and quantitative sputum bacillary load in cases of pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2007;45:4064-6.
74. Perkins MD, Kritski AL. Diagnostic testing in the control of tuberculosis. *Bull World Health Organ* 2002;80:512-3.
75. Perkins MD, Roscigno G, Zumla A. Progress towards improved tuberculosis diagnostics for developing countries. *Lancet* 2006;367:942-3.

76. Pfyffer GE. [Ranking of the polymerase chain reaction (PCR) and of other amplification methods in the diagnosis of tuberculosis]. *Pneumologie* 2004;58:160-4.
77. Raviglione MC. The Global Plan to Stop TB, 2006-2015. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006;10:238-9.
78. Reither K, Saathoff E, Jung J, et al. Low sensitivity of a urine LAM-ELISA in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *BMC Infect Dis* 2009;9:141.
79. Richeldi L. An update on the diagnosis of tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:736-42.
80. Riede U-N, Costabell U. Lungentuberkulose. In Riede U-N, Werner M, Schäfer H-E eds. *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Stuttgart: Thieme, 2004:622-8.
81. Rothschild BM, Martin LD, Lev G, et al. Mycobacterium tuberculosis complex DNA from an extinct bison dated 17,000 years before the present. *Clin Infect Dis* 2001;33:305-11.
82. Sechi LA, Pinna MP, Sanna A, et al. Detection of Mycobacterium tuberculosis by PCR analysis of urine and other clinical samples from AIDS and non-HIV-infected patients. *Mol Cell Probes* 1997;11:281-5.
83. Silbernagl S. Die Funktion der Nieren. In Klinke S ed. *Lehrbuch der Physiologie*. Stuttgart: Thieme, 2003:287-332.
84. Small PM, Perkins MD. More rigour needed in trials of new diagnostic agents for tuberculosis. *Lancet* 2000;356:1048-9.
85. Smieja MJ, Marchetti CA, Cook DJ, et al. Isoniazid for preventing tuberculosis in non-HIV infected persons. *Cochrane Database Syst Rev* 2000:CD001363.
86. Stead WW. The origin and erratic global spread of tuberculosis. How the past explains the present and is the key to the future. *Clin Chest Med* 1997;18:65-77.
87. Stead WW. Tuberculosis in Africa. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998;2:791-2.
88. Su YH, Wang M, Block TM, et al. Transrenal DNA as a diagnostic tool: important technical notes. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1022:81-9.
89. Su YH, Wang M, Brenner DE, et al. Human urine contains small, 150 to 250 nucleotide-sized, soluble DNA derived from the circulation and may be useful in the detection of colorectal cancer. *J Mol Diagn* 2004;6:101-7.

90. Tan EM, Schur PH, Carr RI, et al. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1966;45:1732-40.
91. Tegbaru B, Wolday D, Messele T, et al. Tuberculin skin test conversion and reactivity rates among adults with and without human immunodeficiency virus in urban settings in Ethiopia. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13:784-9.
92. Tessema TA, Bjune G, Assefa G, et al. Clinical and radiological features in relation to urinary excretion of lipoarabinomannan in Ethiopian tuberculosis patients. *Scand J Infect Dis* 2002;34:167-71.
93. Tornieporth N, Lorenz R, Gain T, et al. An unusual case of active tuberculosis of the oesophagus in an adult. *Endoscopy* 1991;23:294-6.
94. Torrea G, Van de Perre P, Ouedraogo M, et al. PCR-based detection of the Mycobacterium tuberculosis complex in urine of HIV-infected and uninfected pulmonary and extrapulmonary tuberculosis patients in Burkina Faso. *J Med Microbiol* 2005;54:39-44.
95. Trunz BB, Fine P, Dye C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. *Lancet* 2006;367:1173-80.
96. Umansky SR, Tomei LD. Transrenal DNA testing: progress and perspectives. *Expert Rev Mol Diagn* 2006;6:153-63.
97. Wang M, Block TM, Steel L, et al. Preferential isolation of fragmented DNA enhances the detection of circulating mutated k-ras DNA. *Clin Chem* 2004;50:211-3.
98. Williams B. Impact of HIV/AIDS on TB. In WHO ed. WHO TB Epidemiology and Surveillance Virtual Workshop.
99. Wu ZL, Wang AQ. Diagnostic yield of repeated smear microscopy examinations among patients suspected of pulmonary TB in Shandong province of China. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;4:1086-7.
100. Zink AR, Grabner W, Nerlich AG. Molecular identification of human tuberculosis in recent and historic bone tissue samples: The role of molecular techniques for the study of historic tuberculosis. *Am J Phys Anthropol* 2005;126:32-47.
101. Zumla A, Mullan Z. Turning the tide against tuberculosis. *Lancet* 2006;367:877-8.



## 9 Anhang

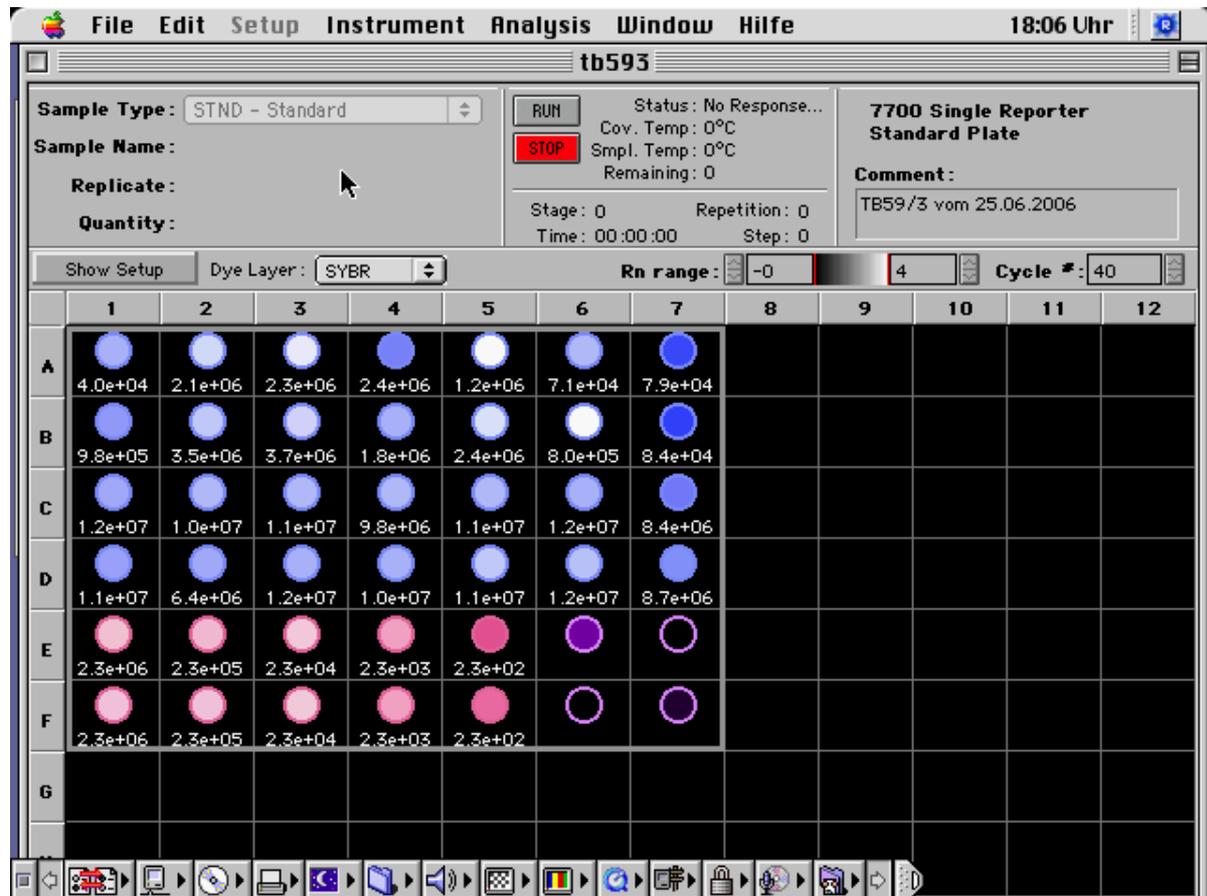


Abbildung A1: Screenshot einer Ergebnisausgabe der ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System Software; hier für die Promega-Extraktion. Beschreibung der Samples A1-A7, B1-B7, C1-C7 und D1-D7 siehe Tabelle 11. E1-E5 und F1-F5 (Duplikate von E1-E5) eingesetzte Standards zur Erstellung der Standardkurve. E 6-7 und F 6-7 Negativkontrollen; e+n=x10<sup>n</sup>

Tabelle A1: Beschreibung der Samples A1-A7, B1-B7, C1-C7, D1-D7 aus Abbildung 23 und deren mittels rt-PCR bestimmte Kopienzahl; \*E+n=x10<sup>n</sup>

Beschreibung	Promega (eingesetzte Menge: 2,76 x 10E+8) Mittels rt-PCR ermittelte Kopienzahl*:	Sample Name
Urin 1 + definierte Menge cfp32DNA, eingesetzt vor der Extraktion	4,00E+04	A1
Urin 2 + definierte Menge cfp32DNA, eingesetzt vor der Extraktion	2,10E+06	A2
Urin 3 + definierte Menge cfp32DNA, eingesetzt vor der Extraktion	2,30E+06	A3
Urin 4 + definierte Menge cfp32DNA, eingesetzt vor der Extraktion	2,40E+06	A4
Urin 5 + definierte Menge cfp32DNA, eingesetzt vor der Extraktion	1,20E+06	A5
Wasser 1 + definierte Menge cfp32DNA, eingesetzt vor der Extraktion	7,10E+04	A6
Wasser 2 + definierte Menge cfp32DNA,	7,90E+04	A7

eingesetzt vor der Extraktion		
Wells 13 bis 19 sind jeweils Kontrollen der Wells 1 bis 7	9,80E+05	B1
Wells 13 bis 19 sind jeweils Kontrollen der Wells 1 bis 7	3,50E+06	B2
Wells 13 bis 19 sind jeweils Kontrollen der Wells 1 bis 7	3,70E+06	B3
Wells 13 bis 19 sind jeweils Kontrollen der Wells 1 bis 7	1,80E+06	B4
Wells 13 bis 19 sind jeweils Kontrollen der Wells 1 bis 7	2,40E+06	B5
Wells 13 bis 19 sind jeweils Kontrollen der Wells 1 bis 7	8,00E+05	B6
Wells 13 bis 19 sind jeweils Kontrollen der Wells 1 bis 7	8,40E+04	B7
Urin 1 + definierte Menge cfp32DNA, eingesetzt nach der Extraktion	1,20E+07	C1
Urin 2 + definierte Menge cfp32DNA, eingesetzt nach der Extraktion	1,00E+07	C2
Urin 3 + definierte Menge cfp32DNA, eingesetzt nach der Extraktion	1,10E+07	C3
Urin 4 + definierte Menge cfp32DNA, eingesetzt nach der Extraktion	9,80E+06	C4
Urin 5 + definierte Menge cfp32DNA, eingesetzt nach der Extraktion	1,10E+07	C5
Wasser 1 + definierte Menge cfp32DNA, eingesetzt nach der Extraktion	1,20E+07	C6
Wasser 2 + definierte Menge cfp32DNA, eingesetzt nach der Extraktion	8,40E+06	C7
Wells 37 bis 43 sind jeweils Kontrollen der Wells 25 bis 31 und 37	1,10E+07	D1
Wells 37 bis 43 sind jeweils Kontrollen der Wells 25 bis 31 und 37	6,40E+06	D2
Wells 37 bis 43 sind jeweils Kontrollen der Wells 25 bis 31 und 37	1,20E+07	D3
Wells 37 bis 43 sind jeweils Kontrollen der Wells 25 bis 31 und 37	1,00E+07	D4
Wells 37 bis 43 sind jeweils Kontrollen der Wells 25 bis 31 und 37	1,10E+07	D5
Wells 37 bis 43 sind jeweils Kontrollen der Wells 25 bis 31 und 37	1,20E+07	D6
Wells 37 bis 43 sind jeweils Kontrollen der Wells 25 bis 31 und 37	8,70E+06	D7

Fortsetzung der Tabelle A1 von Seite 92

Tabelle A2: Ergebnisse der klinischen Samples (LJ-Kultur, Ausstrich, PCR aus dem Urin)  
 Abkürzungen: Ergebnisse Kultur<sup>1</sup>: 1+= 50-100 Kolonien auf Agarplatte, 2+= 100-200 Kolonien auf Agarplatte, 3+= 200-500 Kolonien auf Agarplatte; k.T.m= keine Typisierung möglich; typical MTBC= typisches Wachstum für Mycobacterium tuberculosis complex; atypical MTBC= atypisches Wachstum für Mycobacterium tuberculosis complex, Hinweis für Wachstum atypischer Mykobakterien; Ergebnis des Ausstrichs<sup>54</sup>: 1+= 1-9 säurefeste Stäbchen/pro 100 Gesichtsfelder im Mikroskop, 2+=1-9 säurefeste Stäbchen/pro 10 Gesichtsfelder, 3+=1-9 säurefeste Stäbchen pro Gesichtsfeld.

Nr	LJKultur	Typ des Wachstums	Ergebnis Ausstrich	PCR (Kopienzahl)
0041				0
0051			0	12
0101			0	9
0111			0	0
0121			0	60
0171			0	16
0211			0	0
0221	<20	typical MTBC	0	0
0231			0	0
0241			0	140
0251	<20	typical MTBC	0	130
0261			0	0
0271			0	190
0321			0	120
0331			0	0
0341			0	0
0351			0	16
0411	1+	typical MTBC	3+	0
0421			0	6
0431			0	0
0441			0	95

0481	1+	typical MTBC	3+	0
0491			0	42
0501	<20	atypical MTBC	2+	0
0511			0	5
0521			0	34
0531	<20	typical MTBC	0	390
0541			0	1600000
0551			0	6
0561			0	36
0571			0	0
0581			0	0
0591			0	0
0601			0	210
0611			0	160
0621			0	45
0631			0	59
0641			0	0
0651			0	0
0661			0	5
0671			0	27
0681			0	20
0691			0	7
0711			0	2600000
0721	3+	typical MTBC	3+	11
0731			0	44
0741			0	44
0751			0	0
0761			0	0
0771	<20	typical	2	4

		MTBC		
0781			0	0
0791			0	130
0801			0	0
0811			0	87
0821			0	230
0831			0	50
0841			0	4
0851			0	0
0861			0	15
0871	2+	k.T.m.	0	0
0881			0	10
0891			0	360000
0901			0	25
0911			0	0
0941			0	160
0951	1+	typical MTBC	1+	17
1001	2+	typical MTBC	2+	8
1011			0	0
1021			0	0
1031			0	1600000
1041	2+	typical MTBC	1+	19
1051			0	0
1061			0	530
1071			0	0
1081			0	73
1091	3+	typical MTBC	2+	47
1131			0	0
1141			0	0

Fortsetzung der Tabelle A2 von Seite 94ff.

Tabelle A3: Ergebnisse der ersten (jeweils Nummer mit Endziffer „(1)“) und zweiten Probe (Endziffer „(2)“) bei klinischen Samples, bei denen mindestens der Sputumausstrich oder die LJ-Kultur positiv waren; die PCR wurde nur an einer Urinprobe angewandt

Kultur-Nr.	Ausstrich Ergebnis	LJKultur	Kolonien-Zahl wenn <20	Typ des Wachstums	Ergebnis Urin PCR (Kopien)
22(1)	0	<20	5	typical MTBC	0
22(2)	0	1+		typical MTBC	
25(1)	0	<20	12	typical MTBC	130
25(2)	5	1+		typical MTBC	
41(1)	3+	1+		typical MTBC	0
41(2)	3+	3+		typical MTBC	
48(1)	3+	1+		typical MTBC	0
48(2)	2+	2+		typical MTBC	
50(1)	2+	<20	1	atypical MTBC	0
50(2)	2+	2+		typical MTBC	
53(1)	0	<20	10	typical MTBC	390
53(2)	0	<20	3	typical MTBC	
72(1)	3+	3+		typical MTBC	11
72(2)	3+	3+		typical MTBC	
77(1)	2	<20	3	typical MTBC	4
77(2)	5				
87(1)	0	2+			0
87(2)	0	1+		typical MTBC	
95(1)	1+	1+		typical MTBC	17
95(2)	1+				
100(1)	2+	2+		typical MTBC	8

---

100(2)	1+	2+		typical MTBC	
104(1)	1+	2+		typical MTBC	19
104(2)	0	2+		typical MTBC	
109(1)	2+	3+		typical MTBC	47
109(2)	1+	3+		typical MTBC	

Fortsetzung der Tabelle A3 von Seite 97

## **10 Danksagung**

Mein herzlichster Dank gilt:

Meinem Betreuer und Doktorvater Herrn PD Dr. med. Dr. med. habil. Michael Hölscher für die Anleitung und Heranführung an ein faszinierendes Forschungsthema, das gute persönliche Verhältnis, die wertvolle Unterstützung in jedem Stadium der Dissertation und die Ausbildung in wissenschaftlichem Arbeiten und Schreiben. Ganz besonders bedanke ich mich für die Vermittlung eines Research-Exchange an das University College London und die Unterstützung der Posterpräsentation auf dem qPCR event 2007.

Herrn Professor Dr. med. Thomas Löscher, dem Leiter der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin an der LMU, Herrn Professor Dr. med. Frank von Sonnenburg und Herrn Professor Dr. med. Hans Dieter Nothdurft für ihre Unterstützung, Überlassung von Räumen und Geräten und die angenehme Atmosphäre in ihrer Abteilung.

Herrn Jim Huggett, Ph.D. und seinem Team vom Windeyer Institute in London für die Kooperation und die sehr wichtige fachliche Expertise.

Frau Dr. hum. biol. Martina Gerhardt, Frau Dr. med. Gisela Bretzel, Frau Dr. hum. biol. Vera Siegmund, Frau Erna Fleischmann, Frau Franziska Brandl, Frau Marion Göldner für das Anlernen der Methoden und die freundliche Kooperation im Labor und am Institut.

Dem Team des Mbeja Medical Research Project für das Sammeln und Bereitstellen der klinischen Proben.

Den Patienten und den Freiwilligen für die Bereitstellung von Urinproben.

Frau Pamela Perona für den Transport der Urinproben von Tansania nach Deutschland.

Meiner Familie und Anja für ihre vielfältige Unterstützung.

## 11 Lebenslauf

Name	Andreas Reinhard Johannes Lorenz
Geboren am	16. Oktober 1982 in München
Staatsangehörigkeit	deutsch
Religion	römisch-katholisch
Adresse	Pelkovenstr. 59 80992 München <b>Andreas.Lorenz@med.uni-muenchen.de</b>
Juli 2000	Allgemeine Hochschulreife, Diesterweg-Gymnasium, Plauen
Nov 2000- Feb 2002	Zivildienst am Klinikum r. d. Isar, München, Freiwilligendienst in Nepal
April 2002- Juni 2008	Medizinstudium an der Ludwig- Maximilians-Universität München
Juli 2008	Approbation als Arzt
Seit 1.1.2009	Assistenzarzt am Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung der Ludwig-Maximilians-Universität München